

Chemische Charakterisierung von diagnostischen Glykan-Oberflächen vor und nach Interaktion mit Modell-Analyten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie:
Angewandte Analytik und Umweltchemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der **Humboldt-Universität zu Berlin**

von
M. Sc.-Chem. Carolin Nietzold

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ulrich Panne
2. Prof. Dr. Klaus Rademann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2019

Die vorliegende Arbeit wurde an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) im Fachbereich 6.1 „Oberflächenanalytik und Grenzflächenchemie“, geleitet von Dr. Wolfgang Unger, verfasst. Die Betreuung des Promotionsverfahrens erfolgte durch Prof. Dr. Ulrich Panne, Universitäts-Professor am Institut für Chemie der Humboldt Universität zu Berlin und Präsident der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Kurzfassung

Microarrays haben in den letzten Jahren einen enormen wissenschaftlichen Fortschritt ermöglicht, z.B. in der Genomforschung, der Pharmakologie und der klinischen Diagnostik. Daher zählen sie mit zu den am schnellsten wachsenden Bereichen der biomedizinischen Forschung. Für zukünftige Anwendungen in der Diagnostik muss diese Technologieplattform jedoch ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen. Nur so können die notwendigen Standards erfüllt werden, die eine klinische Zulassung ermöglichen. Die Kontrolle bestimmter Parameter, wie Art, Dichte und Verteilung der Funktionalgruppen bzw. Sondenmoleküle an der Oberfläche der Microarrays ist von immenser Bedeutung, u.a. für die erfolgreiche Immobilisierung der zu bestimmenden Zielanalyten, z.B. DNA, Proteine, Antikörper und Glykane.

Das Hauptanliegen dieser Arbeit war es valide chemische Verfahren für die Optimierung der Gesamtleistung von Glykan-Microarrays bereitzustellen. Dafür erfolgte eine gründliche Untersuchung jedes einzelnen Prozessschrittes innerhalb der Arrayproduktion durch Anwendung komplementärer Methoden der chemischen Oberflächenanalytik. Mit Hilfe von fortgeschrittenen Verfahren der Elektronen-Spektroskopie für die chemische Analyse (ESCA/XPS) wurden valide quantitative Daten bei der chemischen Charakterisierung der Oberflächen erhalten die mit den häufig eingesetzten qualitativen bzw. indirekten Verfahren (z.B. Kontaktwinkel Goniometrie und Fluoreszenz-Spektroskopie) so nicht erhalten werden können. Die robuste Anbindung von Glykanen auf der Substratoberfläche ist Voraussetzung für eine reproduzierbare Anwendung in der Diagnostik, aber auch für die Entwicklung valider quantitativer Charakterisierungsmethoden zur Bewertung der Effizienz der Immobilisierungsreaktionen. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Ansätze für eine stabile Anbindung der Glykan Moleküle auf Silizium- und Glasoberflächen getestet.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Charakterisierung und Optimierung der Glykananbindung an amin-reaktive Oberflächen. Hierzu wurden z.B. spezielle Glykane mit Fluorlabel auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen immobilisiert. Aufgrund des großen Photoionisations-Querschnitt und der damit einhergehenden hohen Messempfindlichkeit ist Fluor als Element für die quantitative XPS-Analytik sehr interessant. Eine Quantifizierung der angebundenen Glykane ist zum Beispiel über die Bestimmung der CF_3 -Gruppe im hochaufgelösten C1s XPS Spektrum möglich. Die Interaktionen Sonde-Analyt wurden modellhaft mit immobilisierten Glykanen und dem Lektin Concanavalin A mit Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik untersucht. Neben der chemischen Charakterisierung frisch präparierter Glykansonden wurde auch das Alterungsverhalten der Glykan-Microarrays untersucht. Das Studium der Alterung ist für die praktische Anwendbarkeit, insbesondere die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen von microarray-basierter Diagnostik sehr bedeutsam.

Die in dieser Arbeit präsentierten Forschungsergebnisse wurden überwiegend mit Hilfe der Röntgen-photoelektronenspektroskopie, der kantennahen Röntgenabsorptionsfeinstrukturspektroskopie und der Flugzeit-Sekundärionen-Massen-Spektrometrie erzielt. Um eine Verbindung zu den typischerweise in der Entwicklung von Mikroarrays eingesetzten Verfahrensweisen herzustellen wurden punktuell auch die Verfahren Kontaktwinkel-Goniometrie und Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

Abstract

Microarrays are essential tools in many research areas, especially in genome research, clinical diagnostics and pharmacology. Glycan research has gained increased interest since glycans are involved in many fundamental biological processes. Due to the enormous impact of microarrays a high degree of reproducibility and reliability is necessitated, especially for analytical and diagnostic applications. For an effective utilization and application of glycan-based microarrays, further research related to immobilization and surface chemistry as well as density, conformation, and accessibility of glycans is indispensable. This is the only way to meet the standards required for clinical approval. The control of specific surface parameters as density and lateral distribution of functional groups is a prerequisite for a reproducible immobilization of probe molecules and coupling of target molecules to be investigated e.g. DNA, proteins, antibodies and glycans.

The objective of this research is to sidestep many of the initial and current problems of glycan microarray based devices by using new analytical approaches to control molecular engineering. For this purpose, a thorough investigation of each individual step in the array production is carried out by applying complementary methods of surface chemical analysis. New fluorophore-free protocols based on methods of surface analysis as XPS will be developed and validated to enable glycan microarray performance optimization. The advantage of these methods is the direct quantitative access to chemical bonds at high lateral resolution. In contrast to the frequently used qualitative or indirect methods (e.g. contact angle goniometry and fluorescence spectroscopy), valid quantitative data are obtained. The robust binding of glycans on the substrate surface, is a prerequisite for a reproducible application in the diagnostics but also for the development of valid quantitative characterization methods for the evaluation of the efficiency of the immobilization reactions. In this study, different approaches for a stable binding of glycan molecules on silicon and glass surfaces were tested. One focus of the work was the characterization and optimization of the glycan binding to popular amine-reactive surfaces. For this purpose, specific glycans with fluorine-label were immobilized on epoxide-functionalized silicon surfaces. Fluorine is of interest for quantitative XPS analysis because of the high measurement sensitivity based on the large photoionization cross-section. A quantification of the attached glycan molecules is possible, for example, by determining the amount of CF_3 groups using the high-resolution C1s XPS spectrum. The interactions between model probe (glycan molecules) and model analyte (lectin concanavalin A) were investigated using powerful methods surface chemical analysis.

In addition to the chemical characterization of freshly prepared glycan probes, the aging behavior of the glycan microarrays was also investigated. The study of aging is very important for the practical applicability, in particular the reproducibility of results of microarray-based diagnostics.

The research results presented in this thesis were carried out predominantly with the help of X-ray photoelectron spectroscopy, near-edge X-ray absorption fine-structure spectroscopy, and time-of-flight secondary ion mass spectrometry. In order to establish a link to the methods typically employed in the development of microarrays, the methods of contact angle goniometry and fluorescence microscopy have also been used on a point-by-point basis.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	V
Abstract	VI
1. Problemstellung und analytische Strategie	1
2. Grundlagen	5
2.1. Microarrays.....	5
2.2. Kohlenhydrat-Microarrays und ihre Bedeutung für die Glykobiologie	7
2.3. Kohlenhydrate	9
2.3.1 Glucose	10
2.3.2 Cyclodextrine	11
2.4 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	13
2.5 Funktionalisierung von Oberflächen für die Anbindung von (Bio)molekülen	16
2.6 Derivatisierung funktionalisierter Oberflächen für die quantitative XPS Analyse	19
2.7 Ringöffnungsreaktionen für die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen	19
2.8 Reduktive Aminierung von Oligoglucose	20
3. Charakterisierungsmethoden	23
3.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS).....	23
3.1.1 Elementarprozess	23
3.1.2 Informationstiefe	24
3.1.3 Chemische Verschiebung.....	25
3.1.4 Kombination von XPS mit chemischer Derivatisierung.....	25
3.2 Kantennahe-Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (near edge X-ray absorption fine structure, NEXAFS)	26
3.3 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS)	27
3.4 Kontaktwinkelmessung	28
3.5 Fluoreszenzscanning.....	30
4. Ergebnisse und Diskussion.....	31
4.1 Übersicht über die in der Arbeit durchgeführten Experimente	31
4.2 Charakterisierung des Epoxid-Templates.....	33
4.3 Derivatisierung von Epoxidoberflächen	37
4.3.1 Derivatisierung mit TFAA für die Quantifizierung	38
4.3.2 Derivatisierung mit TFMBA als Modell für die Glykananbindung	41
4.3.3 Zusammenfassung.....	44

4.4 Oberflächenanalytische Charakterisierung von Modell-Glykan-Oberflächen	45
4.4.1 Immobilisierung von Glucosamin*HCl (Glc-NH ₂ *HCl)	45
4.4.2 Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrin als Modellsystem für eine sensorisch	48
4.4.3 Immobilisierung von Modell-Glykanen mit Fluorlabel.....	59
4.4.4 Zusammenfassung.....	65
4.5 Die Beobachtung von Glykan-Lektin-Interaktionen mit oberflächenanalytischen Methoden	67
4.5.1 Charakterisierung von Concanavalin A mittels XPS und NEXAFS	67
4.5.2 Charakterisierung von Glykan-Con A Interaktionen	69
4.5.3 Zusammenfassung.....	74
4.6 Oberflächenanalytische Charakterisierung von Modell-Glykan-Microarrays	76
4.6.1 Charakterisierung von Modell-Glykan-Microarrays	76
4.6.2 Charakterisierung der Interaktionen von Lektinen mit Glykanspots	82
4.6.3 Alterungsverhalten von Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen.....	85
4.6.4 Langzeitstabilität von Glykan-Microarrays	86
4.6.5 Zusammenfassung.....	92
5. Zusammenfassung und Ausblick	95
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	95
5.2 Ausblick.....	97
6. Experimenteller Teil.....	99
6.1 Präparationen der Oberflächen	99
6.1.1 Referenzproben	99
6.1.2 Oberflächenmodifizierungen	99
6.2 Instrumentelle Analytik	104
6.2.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)	104
6.2.2 Kantennahe-Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (NEXAFS)	105
6.2.3 Flugzeit-Sekundärionen-Massen-Spektrometrie (ToF-SIMS).....	105
6.2.4 Kontaktwinkelmessungen	105
6.2.5 Fluoreszenzmessungen.....	105
6.2.6 MALDI-TOF-MS	106
7. Anhang	107
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	123
9. Abkürzungsverzeichnis	138
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	140

Inhaltsverzeichnis

11. Danksagung	149
12. Selbstständigkeitserklärung.....	151
13. Publikationen.....	153

1. Problemstellung und analytische Strategie

Microarrays finden heutzutage in vielen Bereichen der Wissenschaft Anwendung. Microarrays bestehen aus einem funktionalisierten Trägermaterial wie Glas oder Silizium und den darauf in definierten Arrays immobilisierten biologischen Sondenmolekülen, wie beispielsweise DNA, Proteinen oder Kohlenhydraten. Bereits Ende der 1980er Jahre beschrieben Ekins et. al.^[1] erste Protein-Microarrays. Die Technologien der Microarrays entstanden jedoch erst in den 1990er Jahren, konnten sich aber aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile (hohe Testanzahl pro Zeiteinheit, geringe Probenmenge, gute Automatisierbarkeit) gegenüber herkömmlichen Methoden wie Gelelektrophorese, Chromatographie und ELISA-Verfahren schnell in der Medizin, Pharmazie, Biochemie und Genetik etablieren. Heutzutage können Microarrays mit mehreren hunderttausend Sondenmolekülen pro Quadratzentimeter hergestellt werden und zeitaufwendige analytische Methoden ersetzen^[2]. Die seit den ersten Anwendungen in der Genom-Forschung wachsende Bedeutung der Microarrays und die damit verbundenen diagnostischen Untersuchungen machen es erforderlich die Qualität, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente weiter zu verbessern.

Kohlenhydrate werden in Bezug auf ihre zucker-basierten Wechselwirkungen in biologischen Systemen für die Forschung zunehmend interessant. Außer im Stoffwechsel kommen Glykane vor allem auf der Zelloberfläche und in der zellulären Matrix verschiedener Organismen vor. Diese Kohlenhydrate vermitteln als Proteinliganden, u.a. Signaltransduktion und Zelladhäsion. Mit speziellen Microarrays können Interaktionen von Glykanen untereinander und Wechselwirkungen mit verschiedenen Bindungspartnern simultan untersucht werden.

Microarray-basierte Testsysteme erlangen zunehmende Bedeutung in der medizinischen Multi-Parameter-Diagnostik. Häufig sind diese Microarrays auf Glas- oder Kunststoffträgern realisiert und mittels spezieller Messinstrumente, wie Fluoreszenzscannern, auslesbar. Signaldetektion und -auswertung bleiben große Herausforderungen bei der Entwicklung tragbarer (microarray-basierter) Diagnostiksysteme.

Obwohl microarray-basierte Testsysteme für die Immundiagnostik heute schon erfolgreich eingesetzt werden und für spezielle Fragestellungen kommerziell erhältlich sind^[1], verhindern vorhandene Einschränkungen dieser Technologie bis heute ihren breiten Einsatz^[2]. Hier sind die wichtigsten technischen Probleme aufgeführt, die einer routinemäßigen Anwendung der Microarray-Technologie zum Beispiel in der medizinischen Diagnostik noch entgegenstehen:

- Die Anzahl der immobilisierten Sondenmoleküle auf einer Festphase lässt sich nur ungenügend kontrollieren.
- Oftmals weisen Microarrays nur eine begrenzte Lagerfähigkeit auf, womit eine zeitliche Änderung ihres Ansprechverhaltens einhergeht. Dadurch wird die Kalibrierung des Messsystems erschwert oder unmöglich.
- Die Reproduzierbarkeit der Messresultate in einem bzw. zwischen verschiedenen Laboratorien ist daher oftmals ungenügend.

- Manche Microarray-Messungen zeigen eine nicht ausreichende Sensitivität zur quantitativen Bestimmung eines Biomarkers, wenn dieser in einer komplexen biologischen Probe vorliegt (bspw. Blutserum). Der Sensor soll in der Lage sein, die Analytkonzentration im klinisch relevanten Bereich (500 pmol/l bis 150 nmol/l) quantitativ zu messen.

Zur Herstellung sensitiver analytischer Systeme, welche auf der Interaktion der Liganden mit oberflächengekoppelten Fänger-Biomolekülen basieren, ist die verwendete Methode zur Immobilisierung der Biomoleküle von großer Bedeutung^[3]. Eine Grundvoraussetzung für Analyt-spezifische Messungen in komplexen Medien, wie bspw. Blutserum, ist eine robuste Kopplung der Glykan-Antigene auf der Chipoberfläche die ohne Veränderung der nativen Glykan-Konformation so zu erfolgen hat, dass deren biologische Aktivität nicht beeinflusst wird. Die Durchführung reproduzierbarer und quantitativer Messungen setzt zudem die Kenntnis und Kontrolle der Anzahl der immobilisierten Fängermoleküle voraus.

Für zukünftige Anwendungen in der medizinischen Diagnostik müssen Microarrays ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen, um die gesetzlich geforderten Standards erfüllen zu können. Eine ausführliche chemische Charakterisierung der verschiedenen Grenzflächen in Microarray Strukturen, beginnend bei den modifizierten Trägermaterialien (Template) ist notwendig um die Qualität und Leistung von Microarrays zu verbessern und zu sichern. Für die Untersuchung der Zielanalyten ist die Kontrolle bestimmter Parameter (Art, Dichte und Verteilung) der jeweiligen Funktionalgruppen an den Grenzflächen von grundlegender Bedeutung.

Trotz der stetig wachsenden Bedeutung der Glykobiologie ist die Oberflächenchemie der Glykan-Microarrays oft nur ungenügend kontrolliert. Wie bei anderen array-basierten Technologien, gibt es nur begrenzte Kenntnisse über die Oberflächenchemie, die Dichte von immobilisierten Sonden, die Zugänglichkeit der Sonden sowie ihre konkreten Auswirkungen auf die Microarray-Leistung.

Die Charakterisierung von Glykan-Microarrays mit speziellen Messmöglichkeiten moderner chemischer Oberflächenanalyseverfahren wie XPS und ToF-SIMS ist in der Literatur bisher nur vereinzelt beschrieben^[4-6].

Die chemische Zusammensetzung der Glykan-Oberflächen ist ein wichtiger Parameter, der die Funktionalität eines Microarrays bestimmt. Einer der Schlüsselschritte für die Herstellung von Glykan-Microarrays ist die effiziente Immobilisierung von Glykanen auf funktionalisierten Substraten. Die Kontrolle der Oberflächenparameter wie Dichte und Verteilung der immobilisierten Glykane ist für eine zuverlässige Interaktion mit den Analyten notwendig. Ein kontrollierter Produktionsprozess wird durch eine Qualitätsbewertung der einzelnen Microarray-Produktionsschritte mittels oberflächenanalytischer Methoden durch eine (semi)-quantitative Charakterisierung der neu gebildeten Grenzflächen ermöglicht.

In dieser Arbeit werden unterschiedliche Ansätze für eine stabile Immobilisierung verschiedener Glykane auf einer Substratoberfläche vorgestellt und die Effizienz der Immobilisierungsreaktion untersucht. Hierfür werden unterschiedliche oberflächenanalytische Verfahren vorgestellt und diskutiert: Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS), Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS), Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS), Kontaktwinkelmessung (WCA) und fluoreszenzbasierte optische Techniken. Das Ziel ist die valide chemische Charakterisierung unterschiedlicher

Substratoberflächen (Templates) zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit während der Herstellung (s.a. allg. Schema in Abbildung 1). Zur Verwirklichung der hier genannten Ziele waren folgende Meilensteine zu erreichen:

- Die erfolgreiche chemische Synthese neuartiger, speziell aufgebauter Glykane
- Der kontrollierte, molekulare Aufbau funktionalisierter Oberflächen für die Anwendung als Glykan-Microarrays (Sondenaspekt) durch Einsatz valider quantitativ-chemischer Charakterisierung
- Die Detektion und Quantifizierung der Wechselwirkungen zwischen Sonde und Analyt mit Hilfe fluorophorfreier Protokolle (Analyseaspekt)

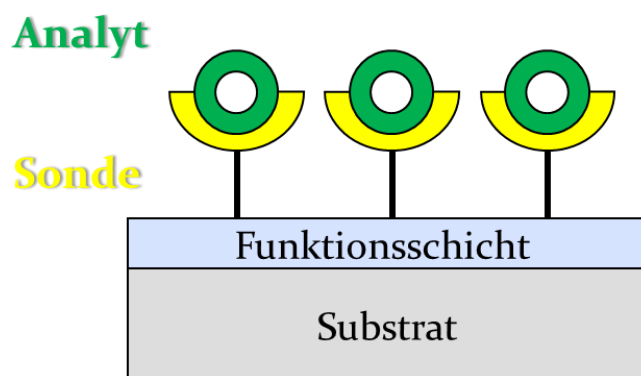


Abbildung 1: Funktionalisierte Substratoberfläche mit kovalent gebundenen Sonden und Analyten Interaktion.

Es existiert ein breites Spektrum möglicher Immobilisierungsreaktionen auf verschiedenen Substratoberflächen mit reaktiven Gruppen, wie alkoholische Hydroxylgruppen (ROH), Carboxylgruppen (RCOOH), Aldehydgruppen (RCHO), Estergruppen (R_1COOR_2) oder auch Epoxidgruppen. In der vorliegenden Arbeit geht es zunächst um die quantitative Analytik von Epoxidgruppen, die von den Projektpartnern im EMRP Projekt BioSurf als besonders wichtige Bausteine in biosensorischen Schichten identifiziert wurden.

Die Reaktivität von Epoxid-funktionalisierten Oberflächen stand dabei im Vordergrund. Mithilfe der chemischen Oberflächenanalytik, z.B. mit der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) können direkte Informationen zur elementaren Zusammensetzung sowie der chemischen Bindungssituation an der Oberfläche geliefert werden. Aussagen zur chemischen Struktur und örtlichen Verteilung von Funktionalgruppen sind ebenfalls möglich. Um die für die Immobilisierungsreaktion verfügbaren Epoxidgruppen zu bestimmen, müssen diese über ein Derivatisierungsreagenz (z.B. TFAA, TFMBA) markiert werden. Die Markergruppe muss ein sicher detektierbares analytisches Signal liefern. Um die Probe danach mittels XPS zu quantifizieren, sollte diese Markergruppe vorzugsweise Heteroatome enthalten. Fluor eignet sich für die XPS-Analyse in besonderem Maße wegen seines großen Photoionisationsquerschnitts, wodurch eine hohe Nachweisempfindlichkeit resultiert. Weiterhin diene 4-(trifluormethyl)benzylamin (TFMBA) als Modellamin für die Untersuchung der kovalenten Immobilisierung von aminierten Glykanen. Weiterhin werden

unterschiedliche Ansätze für eine stabile Anbindung von Glykanen vorgestellt. Hierzu wurden u.a. neuartige, speziell aufgebaute Glykane mit Fluorlabel synthetisiert. Eine Quantifizierung der angebundenen Glykane ist anhand der Detektion der CF_3 -Gruppe im C1s XPS Spektrum gut möglich. Die Bestimmung der chemischen Zusammensetzung sowie der qualitative und quantitative Nachweis immobilisierter Glykane wurde nicht nur mit der XPS sondern auch durch alternative oberflächensensitive Methoden ermöglicht: NEXAFS und ToF-SIMS. ToF-SIMS erlaubt bei Nutzung charakterisierbarer Fragmente grundsätzlich auch markerfreie Analysen mit hoher Empfindlichkeit. Um eine Verbindung zu der in biologischen Anwenderlaboren etablierten Messtechnik herzustellen, wurde punktuell auch das Benetzungsverhalten, d.h. die Hydrophobie/Hydrophilie der Beschichtung, durch Kontaktwinkelmessungen erfasst. Nach der Immobilisierung der Glykane erfolgte die Detektion und Quantifizierung der Wechselwirkungen zwischen Glykan (Sonde) und Analyt, hier modellhaft zwischen Glucose und Concanavalin A (Con A) mittels XPS und NEXAFS. Die Immobilisierung und Quantifizierung von Glykanen auf funktionalisierten Substratoberflächen wurde anwendungsnah auch an Referenz-Microarrays durchgeführt. Mit XPS wurde die Glykananbindung und die anschließende Lektin-Glykan-Interaktion mit Concanavalin A auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen untersucht. Neben der Untersuchung der Glykan-Con A Interaktionen wurde das Alterungsverhalten der Glykan-Spots mittels XPS und ToF-SIMS untersucht. Hierbei wurde im Sinne der Anwendungsnähe zusätzlich ein etabliertes Fluoreszenzmessverfahren eingesetzt.

2. Grundlagen

2.1. Microarrays

Klassische ELISA-Tests kommen weltweit täglich millionenfach zum Einsatz^[7]. Die Entwicklung alternativer, verbesserter Testverfahren birgt daher ein großes wirtschaftliches Potential^[8-9]. Die Miniaturisierung der Immunassays in Form von sogenannten „Microarrays“ Anfang der 1990er Jahre ist ein interessanter Schritt in diese Richtung^[3].

Je nach Anwendungsbereich gibt es verschiedene Arten von Microarrays, bei denen unterschiedliche Sondenmoleküle (cDNA, Proteine, Kohlenhydrate) an die funktionellen Oberflächen gebunden werden. Mithilfe der Sonden können gleichzeitig hunderte oder tausende Hybridisierungsreaktionen komplementärer Nukleinsäurestränge (DNA-Microarrays), Protein-Protein- oder Protein-Wirkstoff-Wechselwirkungen (Protein-Microarrays) untersucht oder im Fall von Kohlenhydrat-Sonden Wechselwirkungen mit Proteinen auf Zelloberflächen nachgeahmt werden (Abbildung 2)^[10].

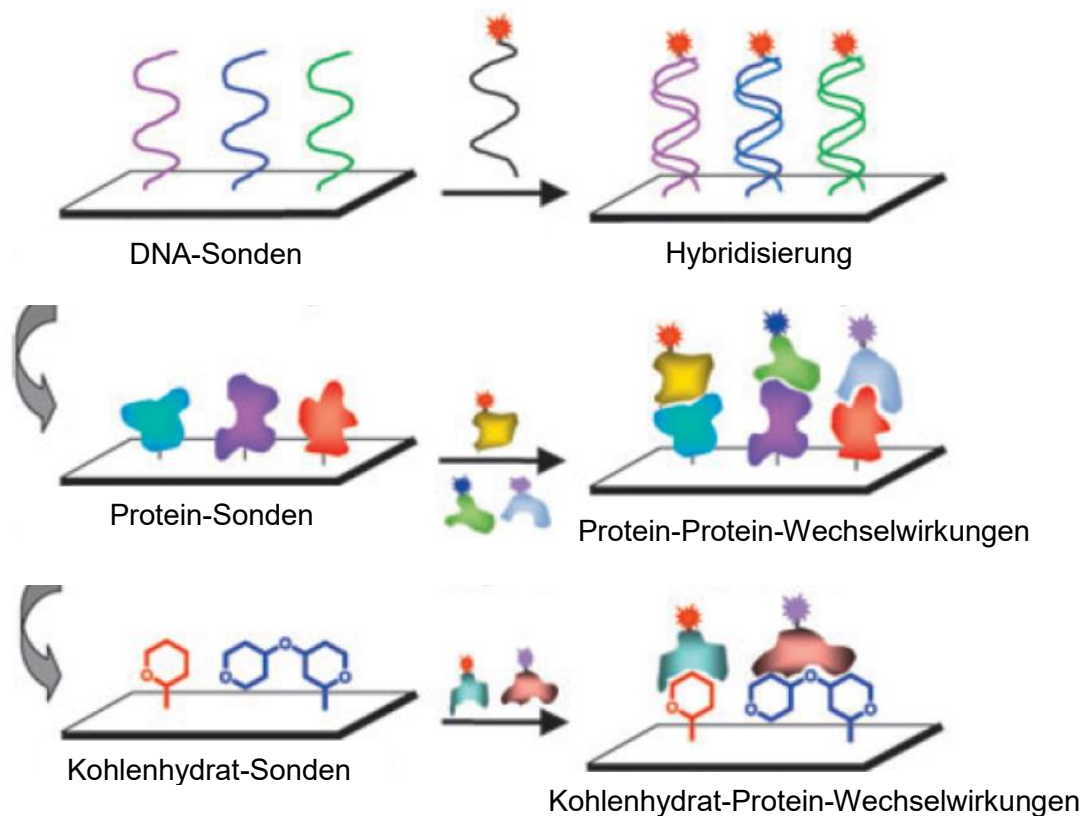


Abbildung 2: Microarray-Arten und ihre Verwendung^[10].

Nach Inkubation der Microarrays mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Proben können die Biochips mit Laser-Scannern (PMT-Detektion) oder mit Imagern (CCD-Kameras) ausgelesen und ausgewertet werden.

Ein Microarray bezeichnet die gitter-ähnliche Anordnung von bis zu einigen Millionen unterschiedlichen Fängermolekülen (auch „Sonden“ oder „Rezeptormoleküle“ genannt) in

kleinen Testfeldern (sog. „Spots“) auf einem planaren Träger^[11], deren Durchmesser unter 250 µm liegt. Durch das geringe Rastermaß dieser Arrays können diese auf einer kleinen Fläche realisiert werden, so dass ein geringes Probenvolumen zur Benetzung des gesamten Microarrays ausreicht. Enthält die auf das Microarray aufgebrachte biologische Probe Analytmoleküle (auch „Parameter“, „Liganden“ oder „Zielmoleküle“), welche spezifisch an die Fängermoleküle binden, können diese Bindungsereignisse anschließend über eine Nachweisreaktion sichtbar gemacht werden. Dementsprechend erlauben Microarrays parallel millionenfache Einzelnachweise mit einer geringen Menge einer Analytprobe^[12]. Dabei lassen sich mit Microarrays gemäß den Berechnungen von Roger Ekins theoretisch Sensitivitäten im einstelligen femtomolaren Bereich erzielen^[13]. In der Praxis werden diese niedrigen Nachweisgrenzen, bedingt u.a. durch die hohen Anforderungen in Bezug auf die Signaldetektion und die Diffusionszeiten, (noch) nicht erreicht^[14]. Die hohe Sensitivität der Microarrays führt in Kombination mit der großen Dichte an Fängermolekülen auf dem Substrat zu einem deutlich verringerten Verbrauch von Proben- und Reagenzienmaterial. Die als Fänger eingesetzten Biomoleküle sind aber teuer und oft nur in begrenzten Mengen verfügbar und weisen zudem häufig noch deutliche Chargenunterschiede auf, so dass jede neue Charge zunächst sorgfältig geprüft werden muss. Der geringere Probenverbrauch der Biochips im Vergleich zu Standard-ELISA in Mikrotiterplatten^[15] erhöht die Anzahl der pro Fängermolekül-Charge herstellbaren Tests um einen Faktor von ungefähr 10^5 . So bedarf es eines Volumens von etwa 100 Mikrolitern der Lösung mit den Fängermolekülen zur Beschichtung („Biofunktionalisierung“) der Kavität einer Mikrotiterplatte, während pro Microarray-Spot weniger als circa ein Nanoliter des Mediums dispensiert werden müssen. Zusätzlich ermöglicht die hohe Sensitivität von Microarray-Tests^[16-18], die Probe in großen Verdünnungen zu messen, so dass der Verbrauch des meist begrenzt verfügbaren Untersuchungsmaterials (z.B. Zelllysate, Säuglingsblut etc.) deutlich reduziert wird^[19-21]. Die Verwendung von Microarrays ermöglicht also die Realisierung einer schnellen Multianalyt-Diagnostik von Probenmaterial^[22]. Microarrays stellen zudem ein wertvolles Werkzeug für die klinische Forschung dar, indem sie die Durchführung großer Studien in einem einfach ausgestatteten Labor erlauben bzw. überhaupt erst realisierbar machen^[23-25]. So wurden vielfältige Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der Microarray-Technologie in der Literatur beschrieben. Neben ihrer „klassischen“ Verwendung in der DNS-Analytik^[26-27], und hier insbesondere zur Detektion von Einzelpunktmutationen in DNS-Strängen^[28], werden sie in jüngerer Zeit auch vielfach in der Proteinanalytik zur Analyse von Proteinaktivitäten^[29-30], bei der Charakterisierung von Enzymen^[17, 31] und zur Bestimmung von Antikörper-Spezifitäten^[32-33] eingesetzt.

2.2. Kohlenhydrat-Microarrays und ihre Bedeutung für die Glykobiologie

Ende der 1980er Jahre wurde der Begriff der Glykobiologie geprägt, womit der Forschungsbereich zur Rolle von Kohlenhydraten innerhalb biologischer Systeme beschrieben wird^[34]. Die Glykobiologie ist dabei eng verflochten mit Bereichen der Immunologie, Virologie und Pharmakologie^[35-36]. In Analogie zu den Begrifflichkeiten Genomik und Proteomik, welche sich mit der Erforschung der Funktionen von Nukleinsäure bzw. Proteinen befassen, spricht man auch von der Glykomik als dem Forschungsgebiet, das sich mit der Aufklärung der Struktur und Funktion von Glykanketten in einem Organismus beschäftigt^[37].

Kohlenhydrate stellen eine große Gruppe von Biomolekülen dar, welche innerhalb und außerhalb von Zellen bzw. gebunden auf deren Oberfläche anzutreffen sind. Sie setzen sich aus diversen Monosacchariden - bei Säugetieren sind es zehn verschiedene Typen - zusammen und treten sowohl als lineare wie auch als stark verzweigte Moleküle auf^[38]. Sie können durch Glykosylierungsreaktionen mit Proteinen zu sogenannten Glykoproteinen verknüpft sein oder sich in Form von Glykolipiden an Oberflächen von Zellen, insbesondere der roten Blutzellen, der Lunge und des Verdauungstrakts, befinden^[38, 39]. Ebenso sind Kohlenhydrate als Glykophospholipide an der Verankerung von Proteinen auf der Zellmembran beteiligt bzw. werden als Polysaccharide in der Glykokalix synthetisiert^[35]. Glykane beeinflussen dabei die Aktivität der konjugierten Proteine oder Lipide und verändern die Faltung und Stabilität der Konformation des Biomoleküls^[36]. Glykane sind über glykosidische Bindungen verknüpfte Oligo- und Polysaccharide. Das breite Spektrum ihrer Funktionen geht dabei mit ihrer strukturellen Vielfalt einher und reicht vom Disaccharidmolekül als Energiespeicher^[38] bis hin zu den vielfach verzweigten Polysacchariden im Schutzmantel einer Zelle^[35]. Weitere Funktionen von Glykanen im Organismus bestehen in der Signalübertragung bei der Inter-Zell-Kommunikation^[30, 40-42] und ihrer Verwendung als strukturbildende Komponenten^[37]. Als Teil der Zellmembran sind Glykane in vielfältiger Weise an Interaktionen der Zelle mit anderen Zellen, Viren, Bakterien und Pilzen beteiligt^[43-48]. Die biologische Funktion der Kohlenhydrate wird dabei durch deren chemische Struktur bestimmt, an welche Proteine, Enzyme und Antikörper binden^[49]. Diese Strukturen weisen aufgrund der Vielzahl möglicher Zusammensetzungen der Furanose- und Pyranose-Ringe als Bausteine dieser Ketten eine hohe Komplexität auf^[38]. Die Analyse dieser Glykan-Strukturen und der mit ihnen wechselwirkenden Biomoleküle ist daher von großem Interesse in vielen wissenschaftlichen Disziplinen, wie beispielsweise der Immunologie, Pharmazie und Systembiologie^[36, 50-52] und stellt durch die Komplexität der Materie eine deutliche Herausforderung für die Analytik dar^[53]. Durch die Weiterentwicklung klassischer Analyseverfahren wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)^[54] oder massenspektrometrischer Verfahren^[55] ist es heute möglich, die Sequenz auch langkettiger Glykan Moleküle und deren Struktur zu bestimmen. Während zur Untersuchung der Wechselwirkung von Glykanen mit Proteinen für gewöhnliche Methoden wie Hämagglutinin-Inhibierungsassay^[56], Affinitätschromatographie^[57], Enzym-gekoppelte Lektin-Assays^[58], Oberflächen-Plasmonenresonanz^[59] und isothermale Titrations-kalorimetrie^[60] herangezogen werden. Alle diese Analysemethoden sind jedoch arbeitsintensiv und benötigen verhältnismäßig große Mengen an Probenmaterial^[49]. Zudem sind es sequentielle Verfahren, so dass für jeden zu testenden Parameter der Test erneut durchgeführt werden muss. Der

resultierende geringe Probendurchsatz erlaubt somit kein breites Wirkstoff-Screening, wie es bspw. pharmakologische Tests verlangen. Aber auch aufgrund des komplizierten Syntheseverfahrens von Glykanketten^[61-62] bzw. dem hohen Aufwand in der Aufreinigung natürlich vorkommender (Poly-)Saccharide^[63-64] bietet sich der Einsatz der Microarray-Technologie an, insbesondere wegen des geringen Materialverbrauchs und der Möglichkeit Hochdurchsatzmessungen in der Untersuchung von Protein-Saccharid-Bindungsvorgängen durchzuführen^[65]. Eine erste Publikation zu diesem Thema wurde zwar schon 1985 veröffentlicht^[66], allerdings rückten die Saccharid-Microarrays erst im Jahre 2002 mit den Veröffentlichungen von Wang, Fukui und Park in den Fokus der Forschungsgemeinschaft^[67-69]. So konnten durch die Verwendung dieser Saccharid-Microarrays bis dato unbekannte Zellmarker entdeckt und bakterielle wie auch virale Erreger in humanem Serum diagnostiziert werden^[67, 70]. Dabei konnten kurze Oligosaccharide sogar direkt an einer Festphase synthetisiert und anschließend dort analysiert werden^[61, 65]. Zur Herstellung von Saccharid-Arrays können unmodifizierte Saccharide auf dem Substrat immobilisiert werden^[71-72]. Dabei ist Glas das meist verwendete Trägermaterial^[47, 73-77], aber auch Gold, Polystyrol und Nitrozellulose werden eingesetzt^[49, 78-79]. Es steht hierzu eine Vielzahl von Immobilisierungsmethoden zur Verfügung, welche sich grundsätzlich in Verfahren mit kovalenter und mit nicht-kovalenter Anbindung unterscheiden lassen.

Viele Forschergruppen untersuchten kovalente Anbindungstechniken von Glykanen, indem sie diese mit funktionellen Gruppen verknüpften, die ihrerseits an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Trägersubstrats binden können. So wurden mit Maleimid-, Hydrazid-, Aminoxy-, Thiol-, Amin- oder Dien-konjugierte Glykane auf Thiol-, Epoxid-, Aldehyd-, Maleimid-, N-Hydroxysuccinimid- (NHS)- oder Benzoquinon-beschichtete Oberflächen angebunden^[71, 73, 75, 80-82]. Beispielsweise lassen sich Mono- und Disaccharide mittels einer Maleimid-Gruppe auf Thiol-funktionalisierten Glasträgern immobilisieren^[69]. Eine weitere, zunehmend eingesetzte Möglichkeit zur kovalenten Verankerung von Sacchariden ist die Verwendung der sogenannten „Click-Chemie“, welche 2001 von Sharpless vorgestellt wurde^[83]. Diese Reaktion eignet sich zur Immobilisierung u.a. von Azidfunktionalisierten Kohlenhydraten mit alkinmodifizierten Glasträgern^[84-85]. Bei dieser Reaktion werden katalytische Mengen von Cu(I) verwendet. Dabei wird oft CuSO₄ als Cu(II)-Quelle benutzt und in situ durch Natriumascorbat zu Cu(I) reduziert. Ravoo et al. haben diese Reaktion im Jahre 2008 erstmals in Kombination mit einem Mikrokontaktdrucker zur Herstellung von Saccharid-Microarrays eingesetzt^[86]. Der Vollständigkeit halber seien hier noch aktuelle Bestrebungen erwähnt, die oben vorgestellten, zumeist komplexen Immobilisierungsreaktionen, in eine Ein-Schritt-Reaktion zu überführen. Hierzu wurden beispielsweise von Park et al. bi-funktionelle Linker verwendet^[87]. Nicht-kovalente Anbindungstechniken wurden ebenfalls untersucht. Man erhoffte sich von diesen eine flexiblere Ankopplung der Kohlenhydrate auf der Oberfläche, so dass sich deren Bindungsstellen einfacher ausrichten können und dadurch mehr Bindungsvorgänge pro Flächeneinheit auf dem Microarray ermöglicht werden^[43]. Es konnten z.B. Lipid- oder Fluor-markierte Oligosaccharide orientiert auf Nitrozellulose/Polyvinyliden-Difluorid-Membranen oder Fluoralkylsilan-beschichteten Glasträgern adsorbiert werden^[68, 88].

Saccharid-Microarrays finden zunehmend Anwendung in der Analyse von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen wie beispielsweise von Lektinen, Antikörpern, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren^[48, 71, 89-90]. Nimrichter et al. haben bereits 2004 gezeigt, wie die

Microarray-Technologie das Studium der Interaktionen von Säugetierzellen mit unterschiedlichen Glykanen ermöglicht, indem beispielsweise die Adhäsion bestimmter Zellen auf Saccharid-Microarrays mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht wird^[91]. Auch sind große Erwartungen mit der Anwendung von Kohlenhydrat-Microarrays für die Untersuchung biomedizinischer Fragestellungen verbunden, insbesondere zur Detektion Erreger-spezifischer Antikörper und pathogener Spezies^[81, 92]. Letztere präsentieren immunogene Glykan-Strukturen auf ihrer Oberfläche, auf welche das Immunsystem des befallenen Wirts mit der Produktion spezifischer Antikörper reagiert^[93]. Der Nachweis dieser Antikörper mittels Saccharid-Microarrays in einer biologischen Probe weist also unmittelbar auf die Präsenz des Pathogens in einem Organismus hin. Saccharid-Microarrays ermöglichen zudem den direkten Nachweis von Bakterien, Viren oder bakteriellen Toxinen^[71]. Auch verspricht man sich viel von einem Einsatz dieser miniaturisierten Testsysteme in der Pharmaforschung^[51], wo Glykankonjugate als mögliche Impfstoffe gegen Grippe-Erreger^[44-46] und HI-Viren^[47, 94] erforscht werden bzw. - wie im Falle der Pneumokokken-Impfung - bereits erfolgreich als Vakzine eingesetzt werden^[95-97]. Die Glykomik ist eine neue, aufstrebende Disziplin, welche aufgrund erster erfolgreich durchgeführter Machbarkeitsstudien in vielen Forschungsbereichen große Zukunftshoffnungen weckt. In der vorliegenden Arbeit sollen insbesondere funktionalisierte -und Glykan-immobilisierte Oberflächen untersucht werden. Die Analytik der biosensorischen Oberflächen erfolgt mittels physikalischer Methoden der Oberflächenanalytik: XPS, NEXAFS und ToF-SIMS.

2.3. Kohlenhydrate

Kohlenhydrate sind der Menschheit bereits seit Jahrtausenden bekannt. Ägyptische Hieroglyphen, indische Aufzeichnungen und selbst das alte Testament berichten vom Gebrauch und von der Verarbeitung von Kohlenhydraten. Die Erforschung der chemischen Struktur von Kohlenhydraten begann jedoch erst im Rahmen der Industrialisierung, durch die auch die Chemie, wie wir sie heute kennen, ihren Anfang nahm. Eine der wichtigsten Persönlichkeiten in diesem Zusammenhang war Emil Fischer^[98]. Ihm gelang Ende des 19. Jahrhunderts die Aufklärung und Beschreibung der relativen Konfiguration der Monosaccharide, wodurch er das Fundament für die heutige Kohlenhydratchemie legte.

Noch bis tief ins 20. Jahrhundert wurde davon ausgegangen, dass die einzigen biologischen Funktionen von Kohlenhydraten in der Speicherung von Energie (z.B. Stärke und Glucose) und im Aufbau von Zellgerüsten (z.B. Chitin und Cellulose) liegen^[99]. Raymond Lemieux veröffentlichte u. a. die erste chemische Darstellung von Saccharose und die Beschreibung des anomeren Effektes^[100, 101]. Mittlerweile steht es außer Frage, dass die biologischen Funktionen von Kohlenhydraten bei weitem diverser sind als noch vor 30 Jahren angenommen.

Dabei finden sich Kohlenhydrate vor allem als Glykokonjugate in Form von Glycoproteinen und Glycolipiden in allen Organismen wieder und erfüllen vielfältige regulatorische Aufgaben. Auf Zelloberflächen exprimiert bilden sie die so genannte Glycocalix, welche in verschiedenen Prozessen, wie z.B. chronische Entzündungen, Metastatisierung von Krebszellen^[99, 102], aber auch Virus- und Bakterieninfektionen, involviert ist. Im Gegensatz zu Polypeptiden und Nukleinsäuren, welche als lineare Biopolymere vorliegen, sind Kohlenhydrate in der Lage, stark verzweigte Strukturen aufzubauen, welche aufgrund der

stereogenen Zentren innerhalb der Monomereinheiten zusätzliche Diversität erlauben. Dadurch wird im Vergleich zu Proteinen und Nukleinsäuren ein weit höherer Informationsgehalt ermöglicht. Die gespeicherte Information wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen, wie z.B. Enzymen, Antikörpern, Lektinen, aber auch Viren und Bakterien ausgelesen^[103, 104].

Die Lektine selbst sind wiederum häufig in die Zellmembran eingebettet, wobei die Kohlenhydrat-erkennende Domäne meist in den extrazellulären Raum zeigt. Sie binden Monosaccharide, Oligosaccharide oder andere saccharidische Strukturen hochspezifisch und reversibel, besitzen jedoch keinerlei katalytische oder Immuno-Aktivität^[105, 104]. Lektine sind di-, bzw. oligovalent und dadurch in der Lage an mehreren Rezeptoren einer einzelnen biologischen Einheit zu binden. Dadurch werden sowohl die Bindungsstärken als auch die Spezifitäten der Interaktionen der Lektine mit biologischen Einheiten verstärkt.

2.3.1 Glucose

Man unterscheidet Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide. Monosaccharide (Einfachzucker) haben eine Kette aus mindestens drei Kohlenstoffatomen als Grundgerüst und weisen eine Carbonylgruppe sowie mindestens eine Hydroxygruppe auf. Sie sind die Bausteine aller Saccharide und können sich zu Disacchariden (Zweifachzuckern), Oligosacchariden (Mehrfachzuckern) oder Polysacchariden (Vielfachzuckern) verbinden.

Polysaccharide sind Saccharide, in denen eine große Anzahl (mindestens zehn) Monosaccharide (Einfachzucker) über eine glycosidische Bindung verbunden sind. Oligosaccharide sind Saccharide, die aus mehreren gleichen oder verschiedenen Monosacchariden (Einfachzuckern) aufgebaut und durch glycosidische Bindungen miteinander verbunden sind. Entsprechend der Anzahl der vorhandenen Monosaccharid-Einheiten spricht man von Di-, Tri-, Tetra-, Pentasacchariden usw., die sowohl linear als auch verzweigt sein können. Die Monosaccharide Ribose und Deoxyribose bilden das Grundgerüst der RNA und DNA. Darüber hinaus sind phosphorylierte Glykane Bestandteil vieler Coenzyme wie zum Beispiel ATP oder NADPH^[99].

Glucose ist das wichtigste Monosaccharid (Abbildung 3) für den Menschen, da es an sämtlichen Stoffwechselwegen des Organismus beteiligt ist. Die Fischer-Projektion ist bei den cyclischen Halbacetal-Formen, siehe 1, unübersichtlich. Um die gewinkelte Anordnung der Kohlenstoff-Kette zu verdeutlichen, wird die Sessel-Darstellung 3 gewählt. Auch die Darstellung 2 ist üblich und stereochemisch eindeutig.

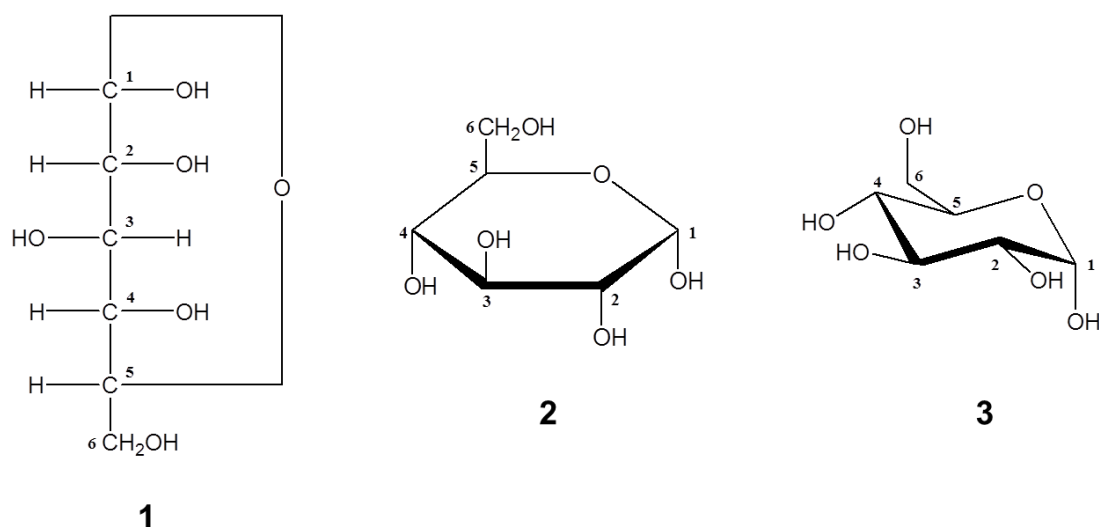


Abbildung 3: α -D-Glucopyranose in Fischer-Projektion, Haworth- und Sessel-Darstellung.

Die Glucose gehört mit sechs C-Atomen zu den Hexosen, dessen OH-Gruppe am C₁-Atom zu einer Aldehydfunktion oxidiert ist (Aldose). Deshalb wird die Glucose auch als Aldohexose charakterisiert. In wässriger Lösung ist Glucose in der Lage, unter Halbacetal-Bildung einen Sechsring zu bilden (Pyranose). Dabei kondensiert die Aldehydgruppe von C₁ mit der OH-Gruppe des C₅-Atoms. Es gibt zwei Enantiomere: D-Glucose und L-Glucose. D-Glucose (Traubenzucker) ist das in der Natur am häufigsten auftretende Monosaccharid. L-Glucose ist nur synthetisch zugänglich und besitzt nur geringe praktische Bedeutung.

Angesichts der Bedeutung der Analytik von Glucose in den Biowissenschaften sind zahlreiche Sonden für Saccharide entwickelt worden. Neben den organischen Boronsäurederivaten^[106], welche oft hochspezifisch an die 1,2-Diolgruppen der Glykane binden, gibt es noch weitere nach Funktionsmechanismen klassifizierte Sondenkonzepte, die selektive Glucose-bindende Proteine (z. B. Concanavalin A) als Rezeptoren verwenden^[107]. Des Weiteren wurden enzymbasierte Methoden entwickelt, die die intrinsische Absorbanz bzw. Fluoreszenz von (fluoreszenzmarkierten) Enzymen als Informationsträger nutzen^[107].

2.3.2 Cyclodextrine

Die Cyclodextrine (CD) sind Vertreter der Stoffklasse der cyclischen Oligosaccharide. Die wichtigsten und für die Anwendungen bedeutendsten cyclischen Oligosaccharide sind α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin und γ -Cyclodextrin. Zu der ringhomologen Reihe gehören auch das 1994 zum ersten Mal erwähnte Cyclodextrin aus fünf Glucose-Einheiten^[108] sowie Cyclodextrine aus mehr als acht Glucose-Einheiten^[109], die sich aber nicht zur Bildung von Einschlussverbindungen eignen. Obwohl durch das Auffinden der Cyclopentaamylose die Nomenklatur mit griechischen Buchstaben als Präfixe, die auf die historische Bezeichnung durch F. Schardinger zurückgeht, nicht sinnvoll fortgeführt werden kann, hat die Bezeichnung α -, β - und γ -Cyclodextrin weiter Bestand. Die Cyclodextrin-Moleküle setzen sich aus sechs, sieben bzw. acht α -D-Glucose-Einheiten zusammen, die wie in den Stärke-Molekülen untereinander α -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Den Ring aus sechs Glucoseeinheiten nennt

man α -Cyclodextrin, den aus sieben β -Cyclodextrin und den aus acht γ -Cyclodextrin (Abbildung 4).

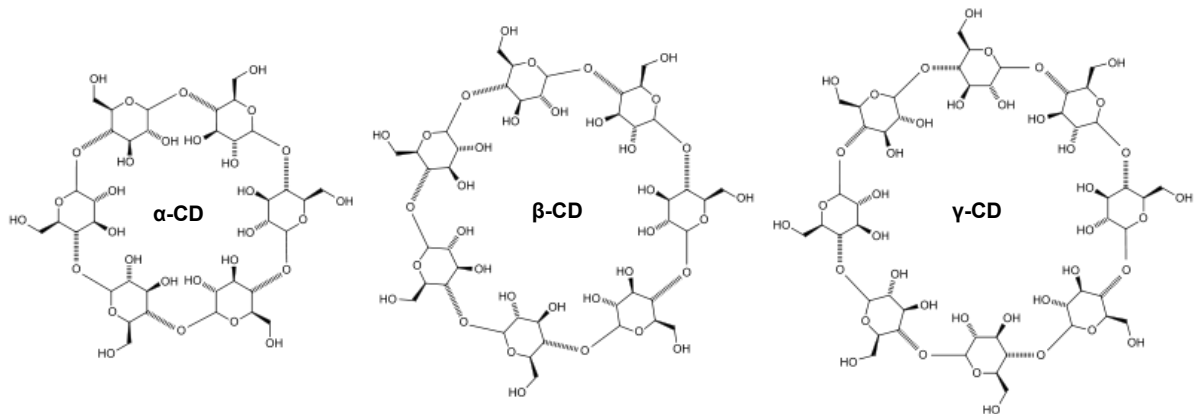


Abbildung 4: α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin und γ -Cyclodextrin.

Cyclodextrine können mit anderen Molekülen Komplexverbindungen bilden. Im Fall der Cyclodextrine spricht man von einer Wirt-Gast-Beziehung. Für die Ausbildung eines Komplexes zwischen Cyclodextrin als Wirtmolekül und einem Gastmolekül müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein: In erster Linie muss das Gastmolekül mit seiner Größe und Geometrie in den Hohlraum des Cyclodextrins passen. Des Weiteren müssen intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast möglich sein und zumindest eine geringe Menge Wasser ist erforderlich. Bei der Bildung der Komplexe nähert sich zunächst das Gastmolekül dem Wirtmolekül (Cyclodextrin) an. Dabei können die hydratisierenden Wassermoleküle aktiv mit den Hydroxylgruppen am Rand des Cyclodextrins wechselwirken. Auf diese Weise schirmen sie das eintretende hydrophobe Molekül von diesen Hydroxylgruppen ab. Dann werden die Wassermoleküle aus dem Hohlraum des Cyclodextrin entfernt und unter Zunahme der Entropie an das umgebende Wasser abgegeben. Nun bilden sich Wechselwirkungen als van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirt und Gast aus. Schließlich wird die Hydratstruktur um den Komplex restrukturiert. Die treibende Kraft der Komplexbildung ist das Auswechseln der Wassermoleküle gegen die hydrophoben Gastmoleküle. Dabei entstehen Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülteilen von Wirt und Gast und die Ringspannung des Cyclodextrin sinkt, was zu einem stabileren Zustand mit geringerer Energie führt. Cyclodextrine sind mit ihren Gastmolekülen nicht durch starke chemische Bindungen verbunden. Es handelt sich im Wesentlichen um van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen. Durch spezifische räumliche Anordnungen können diese so ausgeprägt sein, dass sie die „Stärke“ einer kovalenten Bindung erreichen^[110-113].

Die Fähigkeit von Cyclodextrinen, hydrophobe Substanzen zu binden, ermöglicht ihren Einsatz als Dosiersystem für Arzneimittel in der Pharmazie^[114]. Hierbei wird ausgenutzt, dass hydrophobe Arzneien durch Komplexbildung mit Cyclodextrinen bzw. seinen Derivaten im wässrigen Medium (Blut, Magendarmtrakt) löslich werden. Wirkstoffe, wie z.B. Schmerzmittel, können dann zu den entsprechenden Rezeptoren im Körper transportiert werden^[115-116]. Diese Arznei-Cyclodextrin-Komplexe können somit die Wirksamkeit von Medikamenten deutlich erhöhen.

Einschlussverbindungen von Cyclodextrinen mit Metallkomplexen (Ferrocen)

Cyclodextrine können mit neutralen und geladenen Molekülen Einschlussverbindungen eingehen. So gibt es auch eine Vielzahl von Einschlussverbindungen mit Metallkomplexen. Breslow berichtete schon 1975^[117], dass Ferrocen und α -CD in DMF und DMSO eine Einschlussverbindung bilden. Die kristalline Verbindung wurde jedoch erst 1984 von Harada^[118] durch Zugabe von Ferrocenkristallen zu einer wässrigen CD-Lösung erhalten. Seitdem sind mit einer Reihe von organometallischen Komplexen CD-Einschlussverbindungen hergestellt worden. Metallocene und Metallarene sind typische Gastmoleküle. Es gibt Beispiele für Sandwich-, Halbsandwich- und gemischte Sandwichkomplexe mit verschiedenen Übergangsmetallen (z.B. Ti, Cr, Fe, Co, Mo, Ru, Rh, Os, Pt). Die Struktur motive hängen sowohl von der Wahl des CD als auch der Größe und Ladung des Komplexes ab. Beispielsweise bilden die neutralen Ferrocene mit α -CD 2:1 und mit β - und γ -CD 1:1 Wirt-Gast-Verbindungen, der in Abbildung 5 dargestellten Topologien^[119]. Die Einschlussverbindungen der neutralen Ferrocenkomplexe sind dabei wesentlich stabiler als die Verbindungen mit den oxidierten Ferrocenylkationen^[118, 120].

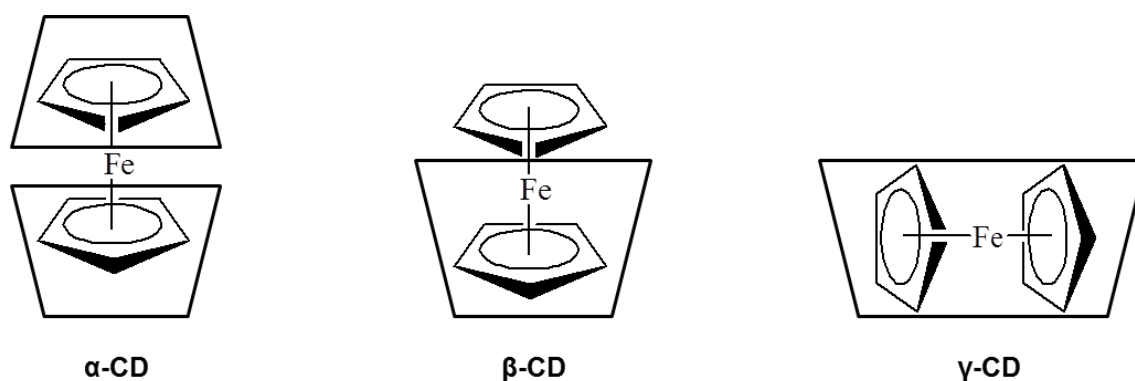


Abbildung 5: Angenommene Strukturen der Ferrocenaddukte mit α -, β - und γ -CD^[118-119, 121].

2.4 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

In der Natur existiert eine Vielzahl von Proteinen, welche nicht kovalent an Glycokonjugate binden. Das AB0-Blutgruppensystem ist ein interessantes Beispiel für eine solche nicht-kovalente, selektive Bindung von Antikörpern an bestimmte Kohlenhydratstrukturen, welche auf den roten Blutkörpern exprimiert sind. Glycosyltransferasen wiederum sind ein gutes Beispiel für Kohlenhydrat erkennende Enzyme. Sie sind für die Anknüpfung von Mono- und auch Oligosacchariden an Proteine und bestehende Oligosaccharid-Core-Strukturen verantwortlich^[122].

Zu den wichtigsten nicht-kovalenten Bindungen zwischen Rezeptor (Protein) und Ligand (Kohlenhydrat) gehören Wasserstoffbrücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Bei den Wasserstoffbrücken fungiert der Bindungspartner, der ein Wasserstoffatom an einem elektronenreichen (meist Hetero-) Atom besitzt, als Donor, während der Bindungspartner mit einem elektronenreichen Heteroatom als Akzeptor fungiert. Aufgrund der großen Anzahl von

Hydroxyl-Gruppen in Kohlenhydratstrukturen sind diese als Wasserstoffbrückendonoren prädestiniert. Die Ausrichtung der Hydroxylgruppen ist wiederum ein wichtiger Faktor für die Spezifität der Bindung^[123]. Diese Form der Spezifitätskontrolle zeigt sich z.B. beim Komplex von Galectin-1 (ein tierisches Lektin) mit *N*-Acetyllactosamin. Dabei nutzt das Protein die sauren Arginin-, Asparagin- und Histidin-Reste, um direkte Wasserstoffbrücken zur axialen 4-OH-Gruppe des Galactoserestes auszubilden^[124]. Dadurch nutzt das Protein mehrere Kontakte zu einer einzelnen Hydroxyl-Gruppe, um zwischen Galactose (4-OH-Gruppe axial) und anderen Glykanen mit einer äquatorialen Ausrichtung der 4-OH-Gruppe zu unterscheiden.

Obwohl Kohlenhydrate über viele polare Gruppen verfügen, sind sie dennoch amphiphil. Das heißt, sie besitzen ebenfalls eine signifikante nicht-polare Oberfläche, welche z.B. mit hydrophoben Aminosäureresten wechselwirken kann. Die ausgebildeten Wasserstoffbrücken bewirken häufig eine passende Ausrichtung der hydrophoben Flächen des Liganden hin zu den hydrophoben Resten der Aminosäuren^[101]. Tatsächlich werden häufig aromatische Aminosäurereste in Bindungstaschen der Lektine gefunden, welche über hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an den passenden Glykanen verstärken. Weiterhin wurde beobachtet, dass Kohlenhydratverbindungen mit aromatischen Aglycon oft mit einer signifikant höheren Affinität gebunden werden, als Kohlenhydratverbindungen ohne aromatische Reste^[125].

Häufig sind Ca^{2+} -Ionen (aber auch Mn^{2+}) essentiell für eine stabile Bindung. Dabei fungieren sie häufig als „Orientierungshilfe“ um wichtige funktionelle Aminosäurereste für die Ligandbindung richtig zu positionieren. Die tierischen C-Typ Lektine bilden gar direkte Kontakte zwischen dem Ca^{2+} Ion, den Hydroxyl-Gruppen des Kohlenhydratliganden und den an der Bindung beteiligten funktionellen Gruppen der Aminosäurereste aus^[126].

Lektine

Alle Proteine mit kohlenhydratbindenden Domänen, die keine Enzyme oder Antikörper (Immunoglobuline) sind, werden per Definition als Lektine bezeichnet. Der Begriff „Lektin“ leitet sich vom lateinischen *legere* ab was so viel bedeutet wie „auslesen, aussuchen oder auswählen“. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurden die ersten Lektine zunächst in Pflanzenextrakten gefunden^[127]. Diese bewirkten ein Zusammenklumpen von roten Blutkörperchen, Agglutination genannt. Später erkannte man jedoch, dass sie in fast allen Organismen – Viren, Bakterien bis hin zu Pilzen und Tieren – vorkommen. 1919 gelang es erstmals J.B. Sumner, ein Lektin, das Concanavalin A (Con A), zu kristallisieren^[128]. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts zeigt sich ein immer größer werdendes Interesse an den Lektinen. Dies beruht vor allem auf der Erkenntnis, dass Lektine als Moleküle für die Zellerkennung von Nutzen sein können^[129].

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung können Lektine unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden, z.B. anhand von Herkunft, Sequenzhomologie, Molekulargewicht oder der Art der an das Lektin kovalent gebundenen Kohlenhydrate. Bei letzterem unterscheidet man zwei Typen: Typ I enthält hauptsächlich D-Mannose, *N*-Acetyl-D-glucosamin, manchmal auch L-Fucose und D-Xylose. Typ II hingegen enthält L-Arabinose und D-Galactose^[125, 130]. Bei der Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen hat sich die Unterscheidung der Lektine nach ihrer Bindungsspezifität durchgesetzt. Dabei werden die

Lektine nach dem Monosaccharid eingeteilt, welches mit der höchsten Affinität gebunden wird, woraus sich fünf Klassen ergeben: D-Mannose, D-Galactose, *N*-Acetyl-D-glucosamin, L-Fucose und *N*-Acetyl-neuraminsäure-bindende Lektine. Dabei gehört Concanavalin A (Con A), ein mannosebindendes Lektin, zu den bekanntesten und am besten untersuchten Lektinen.

Concanavalin A

Concanavalin A (Con A) ist ein Pflanzenprotein und gehört zur Gruppe der Lektine (Abbildung 6). Das hämagglutinierende (blutverklumpende) Lektin Con A wird aus der, in den tropischen Gebieten Amerikas vorkommenden Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) gewonnen^[131].

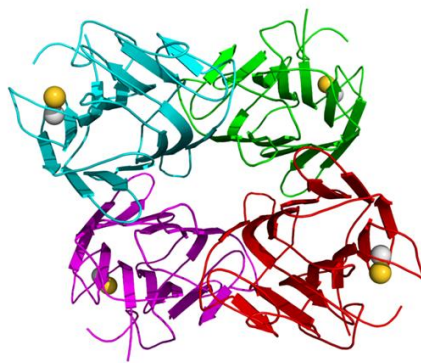


Abbildung 6: Struktur von Concanavalin A (Con A) in Tetramer-Form^[132].

Es hat die höchste Affinität gegenüber terminalen α -verknüpften Mannose-Resten, bindet aber mit geringerer Affinität auch an terminal α -verknüpfte Glucose- und *N*-Acetyl-D-glucosamin-Reste^[104]. Bei neutralem pH-Wert besteht das Lektin aus vier nicht glycosylierten identischen Untereinheiten mit einer Masse von je 26.5 kDa. Jede Untereinheit beinhaltet eine kohlenhydraterkennende Domäne. Unterhalb von pH 5.6 zerfällt das Tetramer zu einem Homodimer mit einer Masse von 52 kDa^[133]. Con A ist ein Metallprotein mit einem Ca^{2+} - und einem Mn^{2+} -Ion pro Monomer. Bei Abwesenheit von Calcium- und Manganionen verliert Con A seine Aktivität^[134].

Con A ist ein Mitogen, die Zellteilungen bei B- und T-Zellen anregen. Dabei bindet es spezifisch an Kohlenhydrat-Antigenstrukturen auf bakteriellen und viralen Zelloberflächen und aktiviert dadurch die T-Lymphozyten^[132, 135]. Die vielfältigen vor allem antiviralen, antibakteriellen, antifungiziden und insektiziden Eigenschaften der meisten pflanzlichen Lektine lassen klar auf die biologische Bedeutung schließen: Schutz vor entsprechenden Bedrohungen. Für den Menschen können diese Eigenschaften durchaus zum Problem werden. So führen die in Bohnen enthaltenden Lektine (wie z.B. das Con A in der Jackbohne) aufgrund der Bindung an Glycoproteine im Verdauungstrakt in größeren Mengen konsumiert zu Verstimmungen im Magen-Darm-Bereich. Da die meisten Lektine jedoch hitzeempfindlich sind, können diese durch Kochen der entsprechenden Nahrungsmittel inaktiviert werden^[136]. Aufgrund des mittlerweile großen Wissens über Con A und der guten Handhabbarkeit findet es heutzutage vielfältige Anwendung, zum Beispiel zur Isolierung von Glycoconjugaten auf immobilisierten Lektin-Säulen^[137], zur Untersuchung von tierischen oder bakteriellen

Zellmembranen oder auch zur Sortierung verschiedener Zelltypen^[137, 138]. Durch die Fähigkeit nur bestimmte Kohlenhydrate zu binden, insbesondere α -D-Glucose, findet Con A eine breite Anwendung unter anderem in der Biochemie. Als Peroxydase-konjugiertes Lektin findet es auch Anwendung bei der Untersuchung von Kohlenhydratligenanden mittels ELLA (enzyme linked lectin assay). Concanavalin A findet oft auch Anwendung in fluoreszenzbasierten Markierungstechniken zur Identifizierung und Quantifizierung von Sacchariden auf einer Substratoberfläche. Die fluoreszenzbasierte Markierungstechnik umfasst die kovalente Anbindung von Fluorophoren an Sondenmoleküle auf der Substratoberfläche und anschließende Detektion dieser Fluorophore.

2.5 Funktionalisierung von Oberflächen für die Anbindung von (Bio)molekülen

Um die Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen zu ermöglichen, müssen diese zuvor entsprechend funktionalisiert werden. Die Art der Funktionalisierung wird dabei durch den Anwendungsbereich (z.B. Biochips) definiert.

Oberflächenmodifizierung und -funktionalisierung sind heutzutage im alltäglichen Leben nicht mehr wegzudenken. Anwendungen in der Materialtechnik, in der Elektronik, in der Automobilindustrie und gar in der Kosmetik sind bereits realisiert worden, wobei die technologischen Fortschritte im Nano- und Mikrometer-Bereich die traditionellen Applikationen erweiterten und revolutionierten^[139-141]. Die Oberflächenmodifizierung beinhaltet Änderungen physikalischer als auch chemischer Eigenschaften der Oberflächen bzw. Grenzflächen durch Verankerung organischer Moleküle bei einer geringen Dicke des Films bis in den monomolekularen Bereich^[139,141, 142-148].

In einem Selbstorganisationsprozess können sich viele Moleküle aus einer flüssigen Phase geordnet auf Oberflächen abscheiden. Je nach den sterischen und chemischen Eigenschaften der Moleküle können unterschiedliche Wechselwirkungen die Ordnung und Dichte der sich selbstorganisierenden Schicht beeinflussen: Zum einen können intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Molekülen auftreten und zu Vernetzungen innerhalb der Schicht führen. Zum anderen finden sich ausgeprägte Affinitäten zwischen den Molekülen und der Oberfläche, wie z.B. zwischen Goldoberflächen und Thiolen bzw. zwischen Glas- oder Siliziumträgern und Silanen.

In der Grundlagenforschung werden fortlaufend neue Modellsysteme entwickelt und optimiert, um die grundlegenden Vorgänge der molekularen Interaktion an Festkörperoberflächen auf Nano-Ebene zu verstehen^[149-156]. Diese Erkenntnisse sind die Grundsteine einer Anwendung auf der makroskopischen Ebene der technischen Systeme. Ein gut definiertes Modellsystem sind selbst-assoziierte Monolagen (Engl.: self-assembled monolayers; kurz: SAMs), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Selbst-assoziierte Monolagen sind organische Dünnschichten auf festen Substraten, wie Metallen oder Oxiden. Bei den organischen SAM-bildenden Molekülen kann es sich um Thiole, Disulfide, Selenole, Silane, Phosphane oder amphiphile Moleküle handeln. Die SAM-bildenden Moleküle sind grundsätzlich aus einer Ankergruppe oder Kopfgruppe, einem Gerüst oder Rückgrat und einer funktionellen Gruppe oder Endgruppe zusammengesetzt (Abbildung 7a)^[139, 142, 144, 157-158].

Ein klassisches Beispiel sind thioolfunktionalisierte Goldoberflächen. Die hohe elektrische Leitfähigkeit von Gold kann dabei zur elektrochemischen Detektion (z.B. in der Biosensorik) verwendet werden^[159].

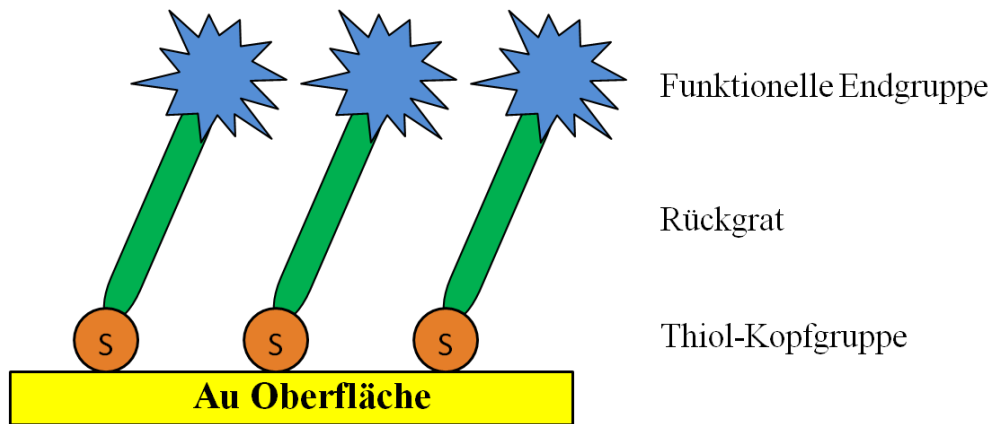


Abbildung 7a: Schematische Darstellung einer selbstassozierten Monolage (SAM) auf Gold.

Die Bindung des Thiols an die Oberfläche erfolgt über die Ankergruppe –SH. Die Ankergruppe eines Alkanthiols hat eine hohe Affinität zur Substratoberfläche und wird bei der Adsorption aktiviert. Dabei werden Bindungen (z.B. S-H-Bindungen bei Thiolen und S-S-Bindung bei Disulfiden) in der Ankergruppe gebrochen und schließlich entstehen neue Bindungen (wie bei Thiolen auf Edelmetallen und Silanen auf Oxiden) oder auch auf elektrostatische Wechselwirkungen beruhende Bindungen (wie bei Langmuir-Blodgett-Filmen) zur Oberfläche.

Die Wahl des Alkyrrückrats (Linker) bestimmt dabei die Dicke der selbstorganisierten Monoschicht (SAM) sowie deren thermodynamische Stabilität. Die Wechselwirkung mit Biomolekülen wird schließlich über die Endgruppe des Thiols bestimmt (Abbildung 7a).

Glasträger und Siliziumchips werden aufgrund ihrer niedrigen Eigenfluoreszenz für Anwendungen mit optischer Detektion genutzt. Ihre chemische Homogenität und Modifizierbarkeit begünstigen zudem den Einsatz zahlreicher funktioneller Gruppen und eine hohe Reproduzierbarkeit^[160]. Reaktive Hydroxygruppen an der Oberfläche der Träger werden mit funktionalen Organosilanen oder Trichlorsilanen modifiziert. Auf diese Weise können neue funktionelle Gruppen wie Amine, Thiole, Epoxide, Carbonsäuren oder Aldehyde eingeführt werden. Abbildung 7b zeigt den Ablauf der Funktionalisierung^[161]. Im ersten Schritt erfolgt die Hydrolyse der Alkoxygruppen der Silanverbindung. Anschließend kondensieren die Silanolreste an der Substratoberfläche. Im Laufe der Zeit kommt es dann zu einer weiteren Vernetzung zwischen den Molekülen.

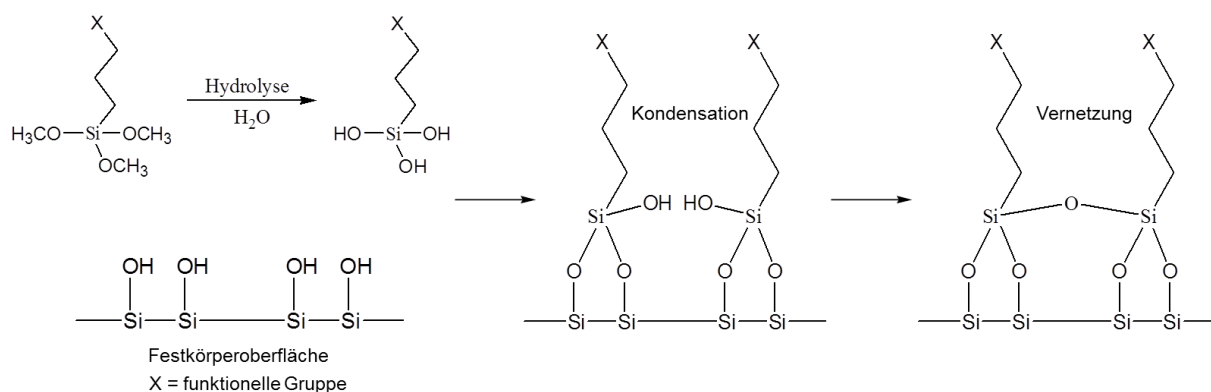


Abbildung 7b: Mechanismus der Silanisierung.

Bei Silanen auf oxidischen Oberflächen werden außer der kovalenten Bindung zur Substratoberfläche auch Quervernetzungen zwischen den selbst-assemblierten Silanmolekülen gebildet. Dadurch wird die Stabilität und Belastbarkeit des SAMs deutlich erhöht.

Die physikalische und chemische Beschaffenheit des Films hängt überwiegend von der funktionellen Endgruppe des SAMs ab. Die Endgruppen sind weitestgehend frei wählbar (mit wenigen Ausnahmefällen, wie z.B. SH -^[162] oder COOH -Endgruppen^[163], bei denen spezielle Präparationsbedingungen erforderlich sind). SAMs können durch Deposition aus Lösungen oder aus der Gasphase hergestellt werden. Die Herstellungsmethode durch Eintauchen des Substrates in die Lösung des Monomers bietet den Vorteil, dass im Gegensatz zur Gasphasen-Methode kein Ultrahochvakuum benötigt wird und sich dadurch eine einfachere Durchführbarkeit im Labor ergibt. Untersuchungen von biologischen Systemen bei Normaldruck im wässrigen Milieu werden dadurch ermöglicht.

Die Anwendungsmöglichkeiten von SAMs sind sehr breit gefächert, z.B. als Ätz-Resistenz, als Barriere des Elektronentransportes in der organischen Molekularelektronik^[151-152, 164-165], als Model für biologische Oberflächen und für die Zellbiologie^[153-154, 166], die Funktionalisierung und Herstellung von Nanopartikeln und als Substrat und Template für die orientierte Kristallisation auf der Oberfläche^[167-168]. Außerdem können SAMs als Vorlage für die Verankerung von weiteren funktionalen Materialien dienen.

Ein häufig angewandtes Verfahren ist die Bildung von Thiol-SAMs auf Goldoberflächen^[169-172]. An den Thiolen können sich z.B. auch N-Hydroxysuccinimid-Endgruppen (NHS-Gruppen) befinden, welche für die Bindung von Proteinen genutzt werden können. Auch an COOH -Endgruppen können verschiedene Proteine nach Aktivierung der COOH -Gruppen durch die EDC/NHS-Methode an die Oberfläche angebunden werden.

Von besonderem Interesse für biochemische Anwendungen sind mit Aminogruppen versehene Schichten. Aminogruppen können genutzt werden um biologisch aktive Moleküle anzubinden. Die entsprechend funktionalisierten Substrate sind zum Teil kommerziell erhältlich. Eine der gängigsten Wege Oberflächen mit primären Aminen zu versehen, ist die Kondensation einer Schicht oder Monolage aus (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES)^[173]. Dabei kondensiert das Silan zu einem engmaschigen Netzwerk mit primären Aminogruppen. Funktionalisierte Silane ermöglichen schließlich die Einführung von z.B. Amin-, Thiol-,

Carbonsäure-, Epoxidresten usw., die nachfolgend für weitere Reaktionen eingesetzt werden können.

2.6 Derivatisierung funktionalisierter Oberflächen für die quantitative XPS Analyse

In der Analytik ist die Derivatisierung eine Funktionalisierung mit dem Ziel Funktionsgruppen auf den Substratoberflächen zu identifizieren und quantifizieren. Das Reagenz wird zu einem spezifischen Marker für die zu quantifizierende funktionelle Gruppe. Enthält das Reagenz z. B. chemisch gebundenes Fluor, so wird das Fluor auf der Probe per XPS identifizierbar und quantifizierbar. Damit ist die Quantifizierung der mit dem Reagenz umgesetzten funktionellen Gruppe möglich. In der chemischen Oberflächenanalytik können Elementgehalte bis zu 0.5 At-% (Atomprozent) sicher nachgewiesen werden. Fluor eignet sich für die XPS-Analyse in besonderem Maße, da dieses Element einen hohen Photoionisationsquerschnitt aufweist und somit eine hohe Messempfindlichkeit realisiert werden kann. Eine Quantifizierung der zur Reaktion mit TFAA (Trifluoressigsäureanhydrid) befähigten funktionellen Gruppen ist z. B. anhand der CF_3 -Gruppe im hoch aufgelösten C1s XPS Spektrum aber auch mit dem F 1s Peak im Übersichtsspektrum möglich.

In Übersichtsartikeln fassen Chilkoti und Ratner verfügbare chemische Derivatisierungsmethoden zur anschließenden XPS Analyse zusammen^[174, 175]. Wie dort zitiert, ist eine unterschiedliche Reaktivität von TFAA in flüssiger- und Gasphase zu beobachten. In der Gasphase reagiert TFAA nur mit Hydroxyl und Aminogruppen, in der flüssigen Phase findet ebenso eine Reaktion mit den Carboxygruppen zu gemischten Anhydriden statt^[176, 177, 162]. Bereits 1988 wurde die hohe Reaktivität und Anwendungsbreite von TFAA für die Derivatisierung von Funktionalgruppen beschrieben^[178]. Gängige fluorhaltige Reagenzien sind aus der Derivatisierungsschemie von Polymeren bekannt, zum Beispiel werden OH-Gruppen auf plasmabehandeltem Polyethylen mit TFAA quantifiziert^[179]. Die Reaktion von Epoxiden mit TFAA führt zur Bildung eines Esters^[180, 181]. Grundlegende mathematische Formeln zur Auswertung der quantitativen XPS-Analysen werden zusammen mit einem Beispiel zur Aminogruppenquantifizierung über PFBA (Pentafluorbenzaldehyd) von Meyer-Plath und Friedrich geliefert^[182]. Carboxygruppenhaltige Polymere sind mit TFE (2,2,2-Trifluorethanol) derivatisiert worden^[183]. Die gebildeten Trifluoressigsäureester und Trifluoracetamide zeigen eine unterschiedliche chemische Verschiebung der C1s Bindungsenergie der Trifluormethylgruppen^[184].

2.7 Ringöffnungsreaktionen für die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen

Epoxidfunktionalisierte Oberflächen können für die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen genutzt werden. Der aufgrund seiner Winkelspannung sehr reaktive Epoxidring kann als Reagenz bei nukleophilen Substitutionen (Abbildung 8) eingesetzt werden^[185]. Auch durch Solvolyse ist eine Ringöffnung möglich^[186]. Im Falle von unsymmetrisch substituierten Epoxiden sind die beiden möglichen Angriffsstellen nicht äquivalent. Die Art des verwendeten Katalysators hat einen starken Einfluss auf das Verhältnis der entstehenden Produkte.

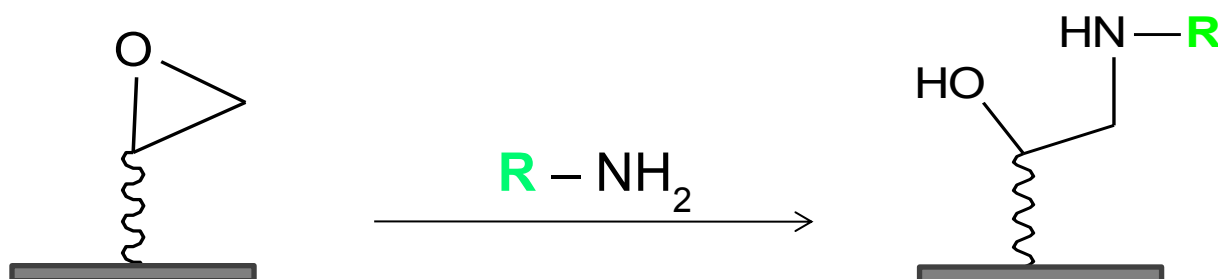


Abbildung 8: Reaktionsschema der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von Glykanen (R) mit Aminolinker.

In der basenkatalysierten Substitution, in der das Nukleophil die treibende Kraft ist, erfolgt die Ringöffnung bevorzugt bzw. ausschließlich am weniger substituierten Kohlenstoffatom, da diese Bindung der angreifenden Spezies sterisch besser zugänglich ist^[187]. Dem gegenüber lagert sich in der säurekatalysierten Ringöffnung ein Proton an den Epoxid-Sauerstoff an, schwächt damit die C-O-Bindung und erleichtert die Bindungsspaltung. Hierbei werden zwei Fälle unterschieden. Wenn die Bindungen im Übergangszustand noch intakt sind, wird das Nukleophil aus den gleichen Gründen wie bei der basenkatalysierten Ringöffnung hauptsächlich am weniger substituierten Kohlenstoffatom angreifen. Sind die Bindungen allerdings schon stark geschwächt, erfolgt der Bindungsbruch weitgehend am höher substituierten Kohlenstoffatom, da sekundäre und tertiäre Kohlenstoffatome leichter die positive Ladung des intermediär entstandenen Carbenium-Ions übernehmen und stabilisieren können als ein Primäres^[186]. Hier spielen also die elektronischen Faktoren eine wesentlich größere Rolle als die sterischen, auch da im Übergangszustand die basische Hydroxy-Austrittsgruppe und das schwache Nukleophil (z.B. Alkohol, Wasser) weit voneinander entfernt sind^[187]. Dabei kann der ringöffnende Schritt monomolekular oder bimolekular sein^[188]. Die Epoxidringöffnung kann durch eine Reihe von Nukleophilen erfolgen. Diese beinhalten u.a. Sauerstoffverbindungen (Wasser, Alkohole), Stickstoffverbindungen (Amine und Aminderivate) und Schwefelverbindungen (Thiole und Sulfide)^[189].

2.8 Reduktive Aminierung von Oligoglucose

Die Synthese von Glykan Molekülen mit Fluorlabel erfolgt in dieser Arbeit auf Basis der reduktiven Aminierung.

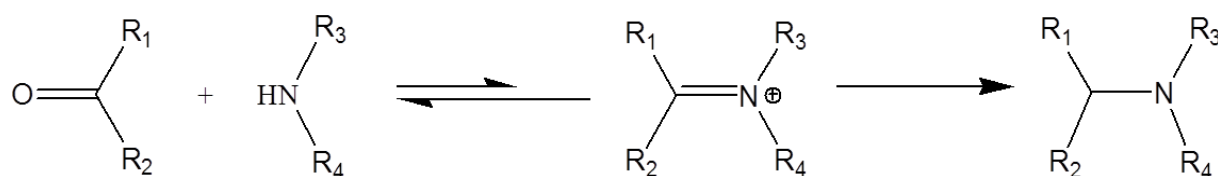


Abbildung 9: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung.

Die reduktive Aminierung,^[190-193] also die Kondensation zwischen einem Aldehyd und einem primären oder einem sekundären Amin andererseits zu einer Schiff'schen Base, die im Folgeschritt zu dem korrespondierenden primären, sekundären oder tertiären Amin reduziert

wird (Abbildung 9), stellt eine ausgesprochen häufig in der organischen Chemie und speziell in der Kohlenhydrat-Synthese angewandte Reaktion dar, da sie mehrere Vorteile bietet:

- Die Reaktion ermöglicht aufgrund ihrer Selektivität eine ausgesprochen schnelle Einführung von Substituenten. Andere eventuell vorhandene Funktionalitäten beeinträchtigen die Reaktion nicht. Potenziell reduzierbare Gruppen, wie Amide, Lactone, Carbonsäuren, Ester, Nitrile, Ether oder Nitrogruppen, bleiben unversehrt.^[191] Die Einführung eines Substituenten ist damit in einem Schritt aus Amino- bzw. Carbonyl-funktionalisierten Glykanen möglich, ohne die Alkoholfunktionen der reagierenden Kohlenhydrate blockieren zu müssen.
- Eine Flexibilität ist dadurch gegeben, dass unterschiedlichste primäre oder sekundäre Amine eingesetzt werden können. Neben Ammoniak sind einfache Alkyl- und Arylamine ebenso verwendbar wie Hydroxylamine, Aminosäuren, Aminoglykane oder Aminosterioide.^[194, 195, 196] Desgleichen sind die verwendeten Aldehyde und Ketone kaum Einschränkungen unterworfen.^[191]
- Die Reaktionsführung ist vergleichsweise anspruchslos. Sowohl eine Reihe von Lösungsmitteln, wie Wasser,^[197] Acetonitril,^[196] Methanol^[191] oder Dichlormethan,^[198] als auch verschiedene Reduktionsmittel, wie Wasserstoff mit Palladium/Aktivkohle,^[194] Raney-Nickel- oder Platin-Katalyse,^[190] Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid^[191] oder Natriumtriacetoborhydrid,^[198] recht variable pH-Werte von 4^[199] bis 8^[200] sowie Reaktionstemperaturen von 20^[198] bis 100 °C^[201] sind beschrieben worden.
- Die Durchführung der Reaktion ist preisgünstig, da weder teure Katalysatoren noch spezielle Reagenzien notwendig sind.

3. Charakterisierungsmethoden

3.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)

3.1.1 Elementarprozess

XPS ist ein UHV basiertes oberflächensensitives Messverfahren, das standardfreie quantitative Aussagen über die Elementzusammensetzung einer Festkörperoberfläche zulässt^[202, 203]. Die Methode basiert auf dem photoelektrischen Effekt. Durch die Bestrahlung mit Röntgenlicht der Energie $h\nu$ wird ein kernnahes Elektron aus seinem Orbital gelöst und verlässt die Oberfläche mit einer für das Emitteratom und die Anregungsenergie charakteristischen kinetischen Energie E_{kin} . Aus der gemessenen kinetischen Energie und der Anregungsenergie kann die Elektronenbindungsenergie E_B bestimmt werden. Es gilt:

$$E_B \cong h \cdot \nu - E_{kin}$$

Da die Bindungsenergien der Rumpfelektronen auch empfindlich für die erste Koordinationssphäre sind, kann aus den Bindungsenergielagen nicht nur die Art der emittierenden Elemente bestimmt werden, sondern es können über Bindungsenergieverschiebungen auch Rückschlüsse auf deren chemische Umgebung gezogen werden. Aus den Peakflächen lässt sich mit Hilfe von spektrometerabhängigen und elementspezifischen Sensitivitätsfaktoren der Gehalt der Atomspezies quantitativ bestimmen. Bis auf Wasserstoff und Helium können alle Elemente nachgewiesen werden. Die Informationstiefe der Methode beträgt bei der typischen Anregung mit Al K α Strahlung bis zu 10 nm bzw. 50 Atomlagen^[204] vgl. auch 3.1.2.

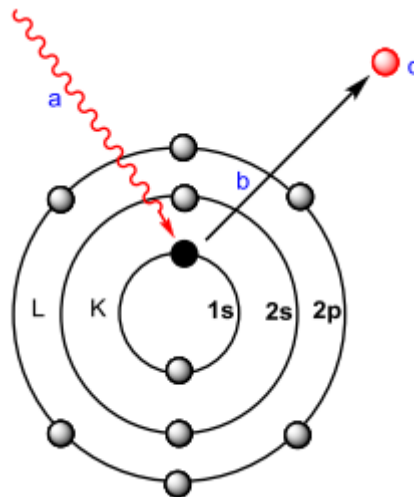


Abbildung 10: Modellhafter Prozess des äußeren photoelektrischen Effektes. Das primäre Röntgenphoton (a) erzeugt (b) ein Photoelektron (c).

Modellhaft lässt sich der photoelektrische Effekt in drei Schritten formulieren (Abbildung 10): Ein Elektron in einem besetzten Orbital wird durch das einfallende Photon angeregt und

als Photoelektron zur Oberfläche transportiert. Diese inverse Elektronenkonfiguration hat nur eine kurze Lebensdauer. Der entstandene Lochzustand relaxiert entweder strahlend durch Aussendung von elektromagnetischer Strahlung als Röntgenfluoreszenz oder nicht strahlend durch die Emission eines Augerelektrons (Abbildung 10).

Diese Augerelektronen sind nicht einfach nur ein „Nebenprodukt“ in der Photoelektronenspektroskopie, sondern begründen eine eigene Spektroskopie, die Augerelektronenspektroskopie. Die kinetische Energie der Augerelektronen liegt im Bereich der Photoelektronen. Sie ist unabhängig von der Energie der einfallenden Röntgenstrahlung, während die der Photoelektronen mit steigender Photonenanregungsenergie zunimmt.

Als Röntgenquellen werden in XPS Geräten vorwiegend Röhren mit Aluminiumanode oder Magnesiumanode verwendet, die charakteristische Röntgenstrahlung mit der Energie von 1486,6 eV (Al K α) bzw. 1253,6 eV (Mg K α) emittieren. Um die spektrale Auflösung zu erhöhen, wird Al K α Strahlung monochromatisiert auf die Probe fokussiert. Nach Einstrahlung auf der Probe erfolgt eine Emission der Photoelektronen, die durch eine Elektronenoptik in einen hemisphärischen Energieanalysator weitergeleitet werden. Am Ausgang des Energieanalysators befindet sich ein Photoelektronenvervielfacher, der die ankommenden Elektronen zählt. Neben diesen grundlegenden Bestandteilen eines XPS Instruments weisen verschiedene Geräte zusätzliche Einrichtungen auf. Zur Verbesserung des Messsignals und damit der Erhöhung der Empfindlichkeit wird ein Elektromagnet hinter der Probe befestigt, der eine zusätzliche Fokussierung der emittierten Elektronen auf den Analysatoreintrittsspalt gestattet. Zur Untersuchung isolierender Proben ist eine Ladungskompensation notwendig, die durch ein Filament realisiert wird, das die Oberfläche der Probe mit niederenergetischen Elektronen überflutet. Da die Messungen im Ultrahochvakuum durchgeführt werden, können nur vakuumfeste Proben untersucht werden^[205-207].

3.1.2 Informationstiefe

Die Oberflächenempfindlichkeit ist eine der bedeutendsten Eigenschaften der Photoelektronenspektroskopie. Entscheidend dafür ist die mittlere freie Weglänge der photogenerierten Elektronen im Material. Diese hängt von der kinetischen Energie der Elektronen und dem Material der Probe ab. Je geringer die Energie der Photonen, desto geringer die Energie E_{kin} der Photoelektronen und damit deren mittlere freie Weglänge oder Informationstiefe. Die sogenannte Informationstiefe wird in der Terminologienorm der Photoelektronenspektroskopie (ISO 18115-1:2013) mit der dreifachen Strecke der mittleren freien Weglänge definiert. Sie entspricht der Tiefe, aus der 95 % der emittierten Elektronen einer kinetischen Energie stammen^[208]. Die geringste mittlere freie Weglänge hat man bei einer kinetischen Energie der Photoelektronen in einem Bereich von 50-70 eV mit ungefähr 0,5 nm. Diese Oberflächenempfindlichkeit wird bei XPS mit niederenergetischer Anregung mit VUV Strahlung am Synchrotron erreicht. Für die bei Labor XPS mit Mg oder Al K α Anregung üblichen kinetischen Energien bis 1000 eV steigt die mittlere freie Weglänge auf etwa 5 bis 10 nm an (z. B. für C 1s und N 1s)^[209-210, 207].

3.1.3 Chemische Verschiebung

Bei chemischen Bindungen mit anderen Atomen werden Elektronen zum Bindungspartner mit größerer Elektronegativität verschoben. Dadurch wird das elektrische Potential des Atoms verändert und die Bindungsenergie der Elektronen verändert sich. Man spricht dabei von der chemischen Verschiebung der Bindungsenergie des Elektrons. Je nach Bindungspartner können verschiedene chemische Verschiebungen auftreten, so dass zum Beispiel bei der Analyse eines organischen Moleküls mehrere trennbare C1s-Komponenten auftreten können, die verschieden chemische Kohlenstoff Spezies repräsentieren. Die elementspezifische Verschiebung der Bindungsenergie liegt in der Größenordnung von bis zu 10 eV^[211].

3.1.4 Kombination von XPS mit chemischer Derivatisierung

Bei chemisch komplexen und heterogenen Oberflächen ist die Analyse der Funktionalgruppenzusammensetzung oft schwierig^[212]. XPS-Spektren von organischen Verbindungen, bei denen Kohlenstoffatome verschiedene chemische Umgebungen bei fast gleichen Bindungsenergien aufweisen, sind nur sehr schwer zu interpretieren. Oft hat man nur einen Peak unter welchem sich mehrere Spezies so überlagern, dass sie mit Hilfe von mathematischen Verfahren (peak fitting) nicht eindeutig getrennt werden können^[213]. Solche Probleme können dann mit Hilfe der chemischen Markierungstechnik (auch Derivatisierung genannt) gelöst werden. In Abbildung 11 ist die Methode der chemischen Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) am Beispiel einer Aminogruppe dargestellt. Diese Markierungstechnik basiert auf der Idee, dass ein Kopplungsreagenz an bestimmte Funktionalgruppen quantitativ und chemisch selektiv gebunden wird. Die Kopplungsreagenzien werden dabei so ausgewählt, dass ein Element eingebracht wird, welches nicht in der zu der analysierenden Oberfläche existiert. Auf diese Weise wird die Funktionalgruppenanalyse in eine Elementaranalyse überführt. Besonders eignet sich hierfür das Element Fluor, da es mit einer hohen Empfindlichkeit gemessen werden kann. Aber auch Stickstoff, Brom und Schwefel sind als Markermoleküle gebräuchlich^[214, 212].

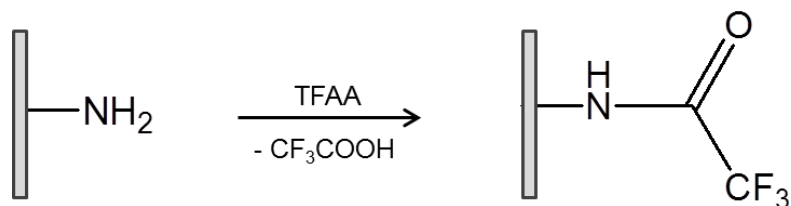


Abbildung 11: Kopplungsreaktion für die chemische Derivatisierung für die quantitative Analytik von Aminogruppen mittels XPS^[215, 216].

Dabei werden an die Derivatisierungsreaktion folgende Anforderungen gestellt^[215, 216]:

- die Derivatisierung einer bestimmten funktionellen Gruppe mit einem Markermolekül soll selektiv verlaufen,

- die Reaktion muss unter milden Bedingungen und vollständig ablaufen können,
- das Produkt muss unter den Analysebedingungen (Vakuum-, Röntgen-Bestrahlung, etc.) stabil sein,
- der Marker muss leicht nachweisbare Atome (z. B. Fluor), die mit einer hohen Empfindlichkeit gemessen werden können, aufweisen.

3.2 Kantennahe-Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (near edge X-ray absorption fine structure, NEXAFS)

NEXAFS ist eine wichtige UHV basierte röntgenspektroskopische Methode zur Untersuchung dünner Schichten, mit der, neben der elektronischen Struktur, auch Vorzugsorientierungen von Molekülen in einer Schicht bestimmt werden. Die Röntgenabsorptionskante ist der Bereich, bei dem die Energie der Röntgenphotonen gerade ausreicht, um in der Probe Elektronen aus einem bestimmten Atomorbital (z. B. einem Rumpforbital wie der K-Schale) anzuregen (Abbildung 12). Zur Ausmessung der Struktur der Röntgenkante benötigt man Röntgenstrahlung variabler Wellenlänge, d.h. eine Synchrotronstrahlungsquelle.

Die kantennahe Röntgenabsorptions-Spektroskopie liefert Informationen über die unbesetzten Zustände nahe der Absorptionskante, d.h. die π^* - und σ^* - Molekülorbitale (LUMO). Die π^* - Orbitale liegen in der Regel tiefer, oft unter der Ionisierungsenergie, während die σ^* - Orbitale im Allgemeinen oberhalb der Ionisierungsenergie liegen.

Nähert man sich mit der Photonenenergie von der niederenergetischen Seite beispielsweise der K-Kante des Kohlenstoffs an, nimmt der Photoionisationsquerschnitt σ zu, bei Resonanzen in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital ist der Photoionisationsquerschnitt besonders groß, demzufolge bilden sich proportional mehr oder weniger photoionisierte Emitteratome mit C1s Rumpflöchern. In unserem NEXAFS Versuchsaufbau beobachten wir Sekundärelektronen, die als CKLL Augerelektronen im Zerfall der Rumpflöcher entstehen, sowie weitere Sekundärelektronen, die durch diese Augerelektronen in weiteren Anregungen beim Weg durch die Probe gebildet werden.

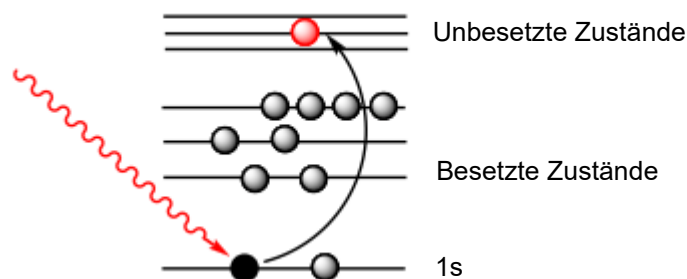


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Elektronenanhebung mit Röntgenstrahlung bei NEXAFS.

Besteht der Kohlenstoff des Oberflächenfilms nur aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff, führt die Anregung in ein σ^* -LUMO. Da diese σ^* -MOs aufgrund ihrer hohen Energie (oberhalb der

Ionisierungsgrenze) in einem quasikontinuierlichen Bereich liegen, ist die $C1s \rightarrow \sigma^*$ Resonanz meist breit und weniger aussagekräftig. Hat der Kohlenstofffilm dagegen π -Bindungen, führen diese zu scharfen Resonanzen ($C1s \rightarrow \pi^*$ Resonanzen). Daher ist NEXAFS besonders zur elektronischen Analyse von ungesättigten Kohlenstoffsystemen geeignet^[217].

Da die genutzte Synchrotronstrahlung linear polarisiert ist, führt die winkelaufgelöste Analyse anisotroper Proben zu winkelabhängigen Absorptionsspektren. Dieser Effekt wird als linearer Dichroismus bezeichnet^[218]. Bei SAMs sind anisotrope Orbitale in einer Vorzugsrichtung orientiert. Das führt zu einer winkelabhängigen Intensitätsverteilung in den Feinstrukturspektren und zur Möglichkeit einer (mittleren) Orientierungsbestimmung, also des Verkippungswinkels des Moleküls relativ zur Oberfläche^[219]. Eine Messung bei einem Einstrahlwinkel von 55° (magischer Winkel) führt andererseits dazu, dass die Intensität nicht mehr von der räumlichen Lage der Moleküle abhängt. Das NEXAFS-Spektrum beinhaltet dann nur noch Informationen über die elektronische Struktur eines Oberflächenfilms.

3.3 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS)

ToF-SIMS ist eine weitere UHV basierte Methode der Oberflächenanalytik. Mit dieser Methode kann qualitativ und quantitativ die elementare Zusammensetzung einer Festkörperoberfläche bestimmt werden.

Beim Beschuss eines Festkörpers mit Ionen hinreichender Energie werden von der Oberfläche neben Photonen, Elektronen und Neutralteilchen auch positiv und negativ geladene Sekundärionen emittiert. Dabei dringt das Primärion in den Festkörper ein und gibt seine kinetische Energie in einer Stoßkaskade an ihn ab (Abbildung 13). In dieser Kaskade wird ein Teil dieser Energie an die Oberfläche zurücktransportiert. Auf diese Weise kommt es zur Emission von geladenen, atomaren und molekularen Sekundärteilchen (Fragmentionen). Der Austritt der Sekundärteilchen ist überwiegend auf die jeweils oberste Atomlage beschränkt, so dass die Voraussetzung für eine hohe Oberflächen sensitivität der Analyse gegeben ist. Im Fall einer Festkörperoberfläche stammen 95% der emittierten Sekundärpartikel eines Primärioneneinschlages aus den ersten beiden Atomlagen, wodurch eine höhere Oberflächenempfindlichkeit im Vergleich zur Labor XPS gegeben ist^[220].

Der primäre Wechselwirkungsprozess besteht in einem inelastischen Stoß zwischen Primärion und Atomen des Festkörpers. Durch die auf einige hundert Stöße verteilte und in ca. 10^{-13} s ablaufende Impulsübertragung auf Targetteilchen kommt es zur Erzeugung einer energiereichen Zone entlang der Primärionenwege. Damit existiert eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für den Austritt eines Teilchens aus der Festkörperoberfläche. Diese gesputterten Teilchen sind Atome, Cluster, Moleküle oder Molekülbruchstücke und sind nur zu einem sehr geringen Teil ionisiert. Molekül- oder Cluster- bzw. Fragment-Ionen können für die verbindungsspezifische Analyse herangezogen werden, da diese unter bestimmten Bedingungen ursprünglich im Festkörper vorhandene Nahordnungen repräsentieren.

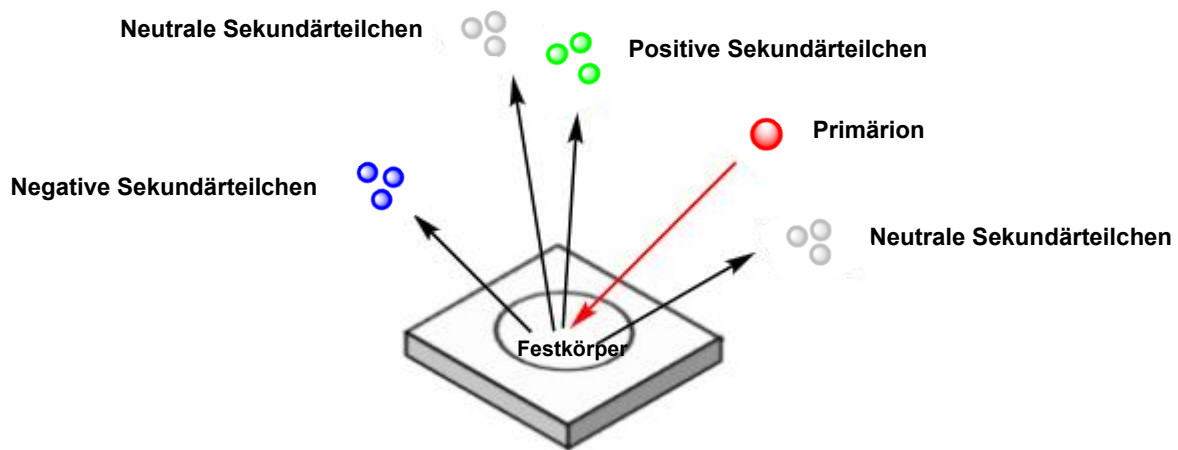


Abbildung 13: Schematische Darstellung des ToF-SIMS-Prinzips. Rot: Primärion; Grün: positiv geladene Teilchen; Blau: negativ geladene Teilchen; Grau: neutrale Teilchen.

Bei der Sekundärionen-Massenspektrometrie wird zwischen verschiedenen Betriebsmodi unterschieden. Ist die Primärionendosis I_p hinreichend gering ($I_p < 10^{13} \text{ PI/cm}^{-2}$), so trifft nahezu jedes Primärion auf einen zuvor noch nicht getroffenen Bereich der Probenoberfläche. Dieser Fall wird als statische SIMS bezeichnet und erlaubt eine weitestgehend zerstörungsfreie Oberflächenanalytik. Die andere Methode, die dynamische SIMS, arbeitet mit einer höheren Primärionendichte, die zu einem sukzessiven Abtrag der Oberfläche führt, vorwiegend elementanalytisch zu interpretieren ist und zur Aufnahme von Tiefenprofilen eingesetzt wird. Die geladenen Teilchen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und im Flugzeitanalysator entsprechend ihrer Flugzeiten (Masse-Ladungsverhältnis m/z) getrennt und registriert.

3.4 Kontaktwinkelmessung

Zu den charakteristischen Eigenschaften einer Oberfläche zählt ihr Benetzungsverhalten, dass grundsätzlich durch Oberflächenchemie und -topographie definiert wird. Im Falle von Biomaterialien wird dem Benetzungsverhalten gegenüber Wasser eine besondere Bedeutung zugemessen, da durch die Hydrophilie bzw. Hydrophobie einer Oberfläche die Wechselwirkungen mit physiologischen Systemen wesentlich beeinflusst werden^[221-224]. Durch Ersetzen der CF_3 -Endgruppe mit einer OH-Endgruppe ändert sich die Benetzbarkeit der Oberfläche erheblich von hydrophob zu hydrophil. Diese Veränderung kann durch Kontaktwinkelmessungen festgestellt werden. Ein Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche ist der Kontaktwinkel θ (vgl. Abbildung 14 a), der die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit auf einem planaren Festkörper charakterisiert.

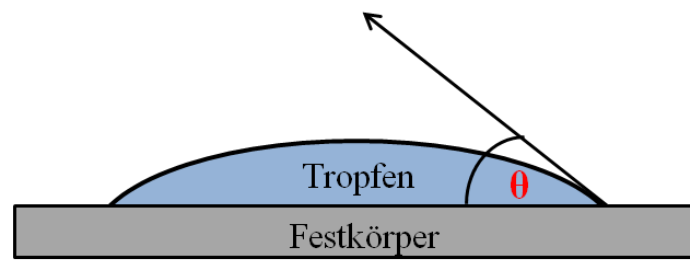


Abbildung 14a: Schematische Darstellung zur Bestimmung des statischen Kontaktwinkels θ .

Die Messung kann mittels der statischen Methode „*Sessile Drop*“ erfolgen. Hierbei „*Sessile Drop*“-Methode wird ein Flüssigkeitstropfen auf die waagerechte Festkörperoberfläche gesetzt. Der Kontaktwinkel θ wird definitionsgemäß als Randwinkel zwischen den Kontaktflächen Festkörper/Flüssigkeit registriert (Abbildung 14a).

Es wird quantitativ zwischen drei verschiedenen Benetzungszuständen differenziert (Abbildung 14b). Man unterscheidet: keine Benetzung, Teilbenetzung oder Spreitung.

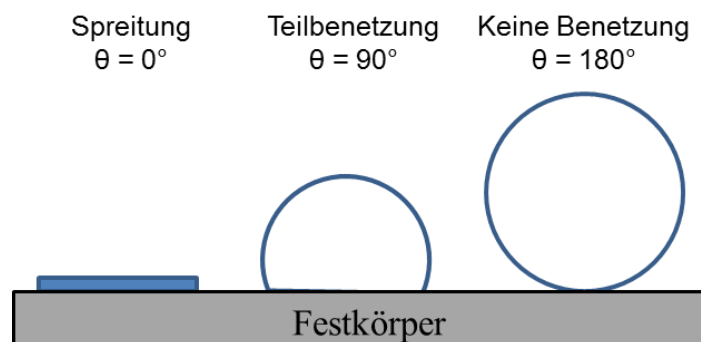


Abbildung 14b: Quantitative Beschreibung des Kontaktwinkels.

Schon geringfügige Veränderungen in der stofflichen Zusammensetzung (Oberflächenchemie), Rauheit der Oberfläche, Temperatur und Druck können sich stark auf die Lage des Benetzungsgleichgewichts auswirken. Gleichzeitig lässt sich die Empfindlichkeit des Kontaktwinkels nutzen, um schnell und einfach qualitative Aussagen über die Festkörperoberfläche und ihre reaktive Veränderungen treffen zu können.

3.5 Fluoreszenzscanning

Obwohl das Phänomen der Fluoreszenz schon seit dem 17. Jahrhundert bekannt ist, machte erst die Entdeckung von George Stokes 1852 dieses auch verständlich. Er erkannte, dass das von fluoreszierenden Stoffen emittierte Licht stets eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht hat (Rotverschiebung)^[225]. Der Unterschied zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum ist dabei vom fluoreszierenden Stoff und von der Umgebung (Lösungsmittelpolarität, pH-Wert etc.) abhängig^[226].

Anschaulich können die Vorgänge der Fluoreszenz in einem Jablonski-Diagramm dargestellt werden^[227]. Absorbiert ein Elektron im Grundzustand S_0 elektromagnetische Strahlung kommt es zum Übergang des Elektrons in einen angeregten Singulett-Zustand (S_1). Nach der Anregung springt das Elektron strahlungslos auf ein niedrigeres Schwingungsniveau des S_1 -Zustandes zurück (Relaxation, VR). Fluoreszenz wird beobachtet, wenn das angeregte Elektron anschließend unter Aussenden eines Photons auf ein Schwingungsniveau des Grundzustandes zurückfällt. Die Energie des emittierten Photons ist dabei von der Energiedifferenz zwischen dem oberen und dem unteren Niveau abhängig. Der Prozess der Fluoreszenz kann bei vielen Molekülen (organische Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen) leicht durch UV-Strahlung oder sichtbares Licht angeregt werden. Diesen Umstand macht man sich bei den Fluoreszenzmessungen zunutze. Sie bietet im Gegensatz zu Absorptionsmessverfahren den Vorteil, dass keine relativen sondern absolute Intensitäten gemessen werden, was zu einer Erniedrigung der Nachweisgrenze für Moleküle um zwei bis drei Größenordnungen führt.

Mit einer Fluoreszenzmarkierung lässt sich die Empfindlichkeit des Nachweises von funktionellen Gruppen an Oberflächen oder in dünnen Schichten erhöhen. Das Material wird durchstrahlt und die Messinformation stammt aus dem gesamten durchstrahlten Bereich. Das Prinzip der Fluoreszenzmarkierung besteht darin, an eine funktionelle Gruppe einen fluoreszierenden Farbstoff (Marker) zu binden und dessen Fluoreszenzintensität zu bestimmen.

Der Nachweis der Bindung zwischen dem gebundenen und dem freien Interaktionspartner geschieht in der Microarray-Technologie meistens über eine Messung von Fluoreszenzintensitäten (Pixelintensität pro Fläche). Die Fluoreszenzmoleküle sind in der Regel an die Analytmoleküle gebunden, so dass nach der Bindung beider Partner (Sonde + Analyt) ein spezifisches Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Scanners gemessen und in ein digitales Format übersetzt werden kann.

Die Anforderungen an einen Microarray-Scanner (Lesegerät) sind folgende: ein Microarray-Scanner muss eine sehr hohe spektrale Auflösung besitzen und Spots mit einem Abstand von wenigen Mikrometern hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität deutlich voneinander unterscheiden können. Die Anregung der Fluoreszenz geschieht in der Regel mit einem Laserstrahl. Er wird über verschiedene Filter, Linsen und Spiegel auf die Chip-Oberfläche gelenkt. Die Fluorophore absorbieren das Laserlicht und emittieren längerwelliges Licht, das wiederum über Filter, Spiegel und Linsen in einen Photomultiplier (oder auch eine CCD-Kamera) geführt wird, der es verstärkt. Anschließend wird das so ausgelesene Fluoreszenz-Signal in eine digitale Information umgewandelt und in einem bestimmten Bildformat dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Übersicht über die in der Arbeit durchgeführten Experimente

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung und Optimierung (1) der Oberflächenfunktionalisierung von Microarray Templaten, (2) der Sondenimmobilisierung sowie (3) der anschließenden Analytbindung. Diese Schritte der Glykan-Microarray-Herstellung werden modellhaft auf Siliziumoberflächen durchgeführt. Die Idee hierbei ist es valide Verfahren für eine weitgehende chemische Kontrolle der einzelnen Produktionsschritte bereitzustellen. Die Immobilisierungseffizienz verschiedener Glykan Moleküle auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen sowie die anschließende Analytbindung wird untersucht. In der folgenden Tabelle sind alle Oberflächenexperimente sowie das jeweils ausgewählte Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik dargestellt (Tabelle 1a).

Substrat	Schicht	Analyse
Si-Wafer	Epoxid	XPS, NEXAFS, KW
Si-Wafer	Epoxid + TFAA	XPS, KW
Si-Wafer	Epoxid + TFMBA	XPS, NEXAFS, KW
Si-Wafer	Epoxid + Glc-NH ₂	XPS, KW
Si-Wafer	Epoxid + CD	XPS, ToF-SIMS, KW
Si-Wafer	Epoxid + CD + TFMBA	XPS, NEXAFS, KW
Si-Wafer	Epoxid + CD + Ferrocen	XPS, KW
Si-Wafer	Epoxid + Glc ₃ -ATFMP	XPS, NEXAFS
Si-Wafer	Epoxid + Glc ₃ -TFMBA	XPS, NEXAFS
Si-Wafer	Epoxid + Glc ₃ -ATFMP + Con A	XPS, NEXAFS
Si-Wafer	Epoxid + Glc ₃ -TFMBA + Con A	XPS, NEXAFS

Tabelle 1a: Überblick über die einzelnen Experimente an Glykan-Microarray Modellen auf Siliziumoberflächen mit den jeweils eingesetzten Verfahren der Oberflächenanalytik (TFAA = Trifluoressigsäureanhydrid; TFMBA = Trifluormethylbenzylamin; CD = Cyclodextrin; Glc₃-TFMBA = Maltotriose mit Trifluormethylbenzylamin-Label; Glc₃-ATFMP = Maltotriose mit Aminotrifluormethylpyridin-Label; Con A = Concanavalin A).

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgt mit Hilfe der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS), der kantennahen Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (NEXAFS), der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) sowie Kontaktwinkel-Goniometrie (KW).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erarbeitung von Methoden zur Charakterisierung der Effizienz von Sondenimmobilisierung und anschließender Analytbindung in einem anwendungsnahen Microarrayexperiment. Hierfür werden reale Objektträger als Substrate für Glykan-Microarrays funktionalisiert und mit Hilfe der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS), Flugzeit-Sekundärionen-Massen-spektrometrie (ToF-SIMS) sowie durch die Anwendung von fluoreszenzbasierten Techniken untersucht. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Microarray-Experimente sowie jeweils ausgewählte Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik dargestellt (Tabelle 1b).

Substrat	Schicht	Analyse
Glas	Epoxid	XPS
Glas	Epoxid + Glc ₄ -AB	XPS, ToF-SIMS
Glas	Epoxid + Glc ₅ -AB	ToF-SIMS
Glas	Epoxid + Glc ₄ -AB + Con A	XPS, Fluoreszenz
Glas	Epoxid + Glc ₅ -AB + Con A	Fluoreszenz

Tabelle 1b: Überblick über die einzelnen Experimente (Glasoberflächen) mit den gängigen Methoden der Oberflächenanalytik (Glc₄-AB = 4 verknüpfte Glucoseeinheiten mit Aminobenzamid-Label; Glc₅-AB = 5 verknüpfte Glucoseeinheiten mit Aminobenzamid-Label; Con A = Concanavalin A).

4.2 Charakterisierung des Epoxid-Templates

Für die Untersuchung von Microarray-Modellen wird in dieser Arbeit auf Siliziumoberflächen, die mit Epoxidgruppen funktionalisiert sind, zurückgegriffen. Die Epoxidfunktionen dienen als reaktive Ankergruppen für die kovalente Immobilisierung von speziell aufgebauten Glykan Molekülen mit Aminolinker und zeichnen sich durch große Reaktivität und Selektivität bei Ringöffnungen mit Aminen aus. Die Glykan Moleküle wurden über reduktive Aminierung von Kohlenhydraten hergestellt. Bei den Epoxidringöffnungen wird die hohe Nucleophilie von Aminogruppen genutzt, um selektive Reaktionen durchzuführen. Die nucleophilen Epoxidringöffnungen mit endständigen Oxiranen führen überwiegend zu den endständigen Additionsprodukten. Die Reaktionen wurden unkatalysiert durchgeführt. Epoxidringöffnungen können einfach und schonend in polaren Lösemitteln bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Siliziumwaferoberflächen sind aufgrund der ähnlichen Oberflächenbeschaffenheit als Modell für Glasoberflächen gut geeignet, die oft als Template für die Herstellung von Microarrays genutzt werden. Siliziumwaferoberflächen bieten den Vorteil, dass die XP-Spektren weniger komplex sind und Linienüberlagerungen mit weniger relevanten Konstituenten aus dem Glas, wie z.B. Bor und Kalium, vermieden werden.

Um Siliziumwafer- bzw. Glasoberflächen mit Epoxidgruppen zu modifizieren, wurde ausgehend von erfolgreichen Vorarbeiten^[228] 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) als Silanisierungsreagenz genutzt. Die Methoxygruppen des Alkyltrimethoxysilans fungieren als Abgangsgruppen. Der Kontaktwinkel betrug unmittelbar nach der Funktionalisierung $\sim 54^\circ \pm 1^\circ$. Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen stimmen mit Literaturwerten für diese Art von Epoxidoberflächen gut überein^[229-230].

Die XPS erlaubt den Nachweis der chemischen Zusammensetzung der Substratoberfläche und darauf basierend die erfolgreiche Funktionalisierung mit Epoxidgruppen. Die Abmessungen der mit XPS analysierten Bereiche entsprechen etwa einer Ellipse von $700 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$.

Um die GOPTS-Funktionalisierung der Substratoberfläche nachzuweisen, wurden jeweils Übersichtsspektren und hochaufgelöste Kohlenstoff- (C1s) und Sauerstoffspektren (O1s) aufgezeichnet (vgl. Abbildung 15b und 16a). Mit Einführung der funktionellen Epoxidgruppen auf der natürlich oxidierten Siliziumwaferoberfläche steigt der Kohlenstoffanteil, während die Sauerstoff- und Siliziumoberflächenkonzentrationen relativ dazu sinken (Abbildung 15a).

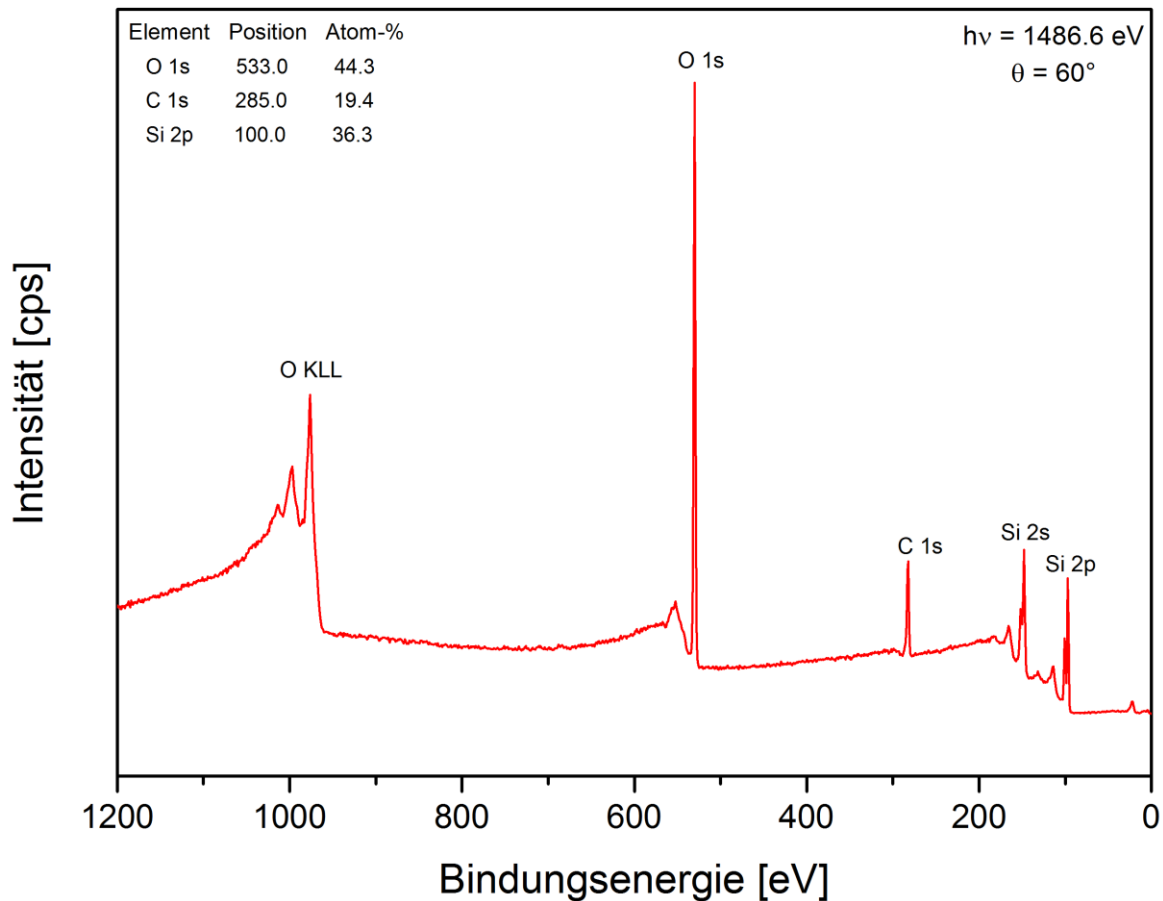


Abbildung 15a: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) einer Siliziumwaferoberfläche.

Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da mit steigender Flächendichte der Epoxidgruppen der Kohlenstoffanteil auf der Siliziumwaferoberfläche zunimmt, während Silizium von der Epoxidschicht abgedeckt wird und somit zurückgeht.

Es wurden auch hochaufgelöste O1s Spektren aufgenommen. In diesen Spektren überlagert sich das Sauerstoffsignal der Epoxidgruppen bei 532.7 eV mit denen der SiO₂-Komponente bei 529 eV und der SiOH-Komponente bei 531 eV. Wegen dieser nicht auflösbaren Überlagerung wird im Weiteren auf eine detaillierte Analyse der O1s Spektren verzichtet.

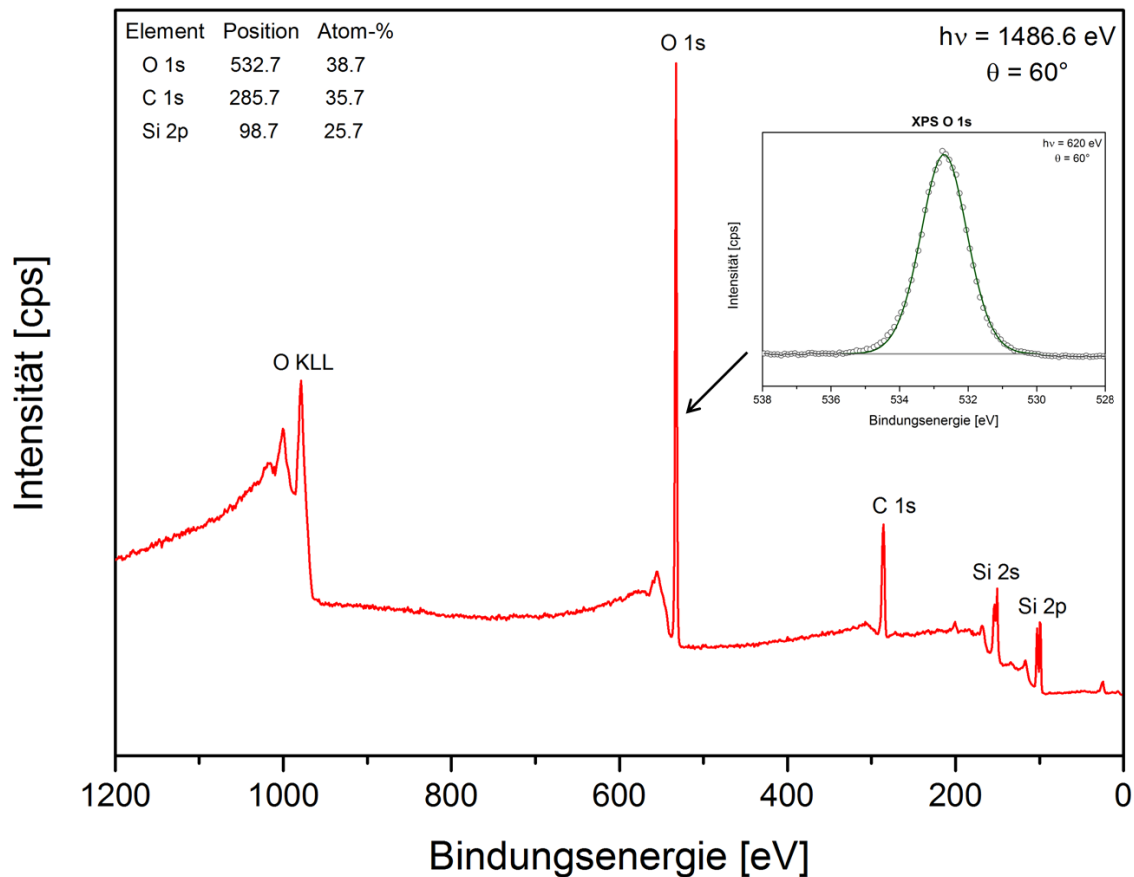


Abbildung 15b: XPS Übersichtsspektrum ($Al K\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöstes Synchrotron XPS O1s Spektrum ($h\nu = 620 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von $\sim 1 \text{ nm}$) einer GOPTS-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche **1**.

Es wurden auch hochaufgelöste C1s Spektren von den Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen aufgezeichnet. Dominiert werden diese Spektren von zwei Hauptkomponenten bei 285.0 eV und 286.7 eV (siehe Abbildung 16a und Tabelle 2). Diese Bindungsenergien entsprechen den Signalen der C-C und C-O Bindungen^[228]. Zum C-O Peak tragen die C-O Bindungen des Epoxids und des Ethers aus dem GOPTS Molekül bei. Der Anteil der C-C-Komponente bei 285 eV ist durch unvermeidliche Kontamination mit Kohlenwasserstoff-Adsorbaten überhöht.

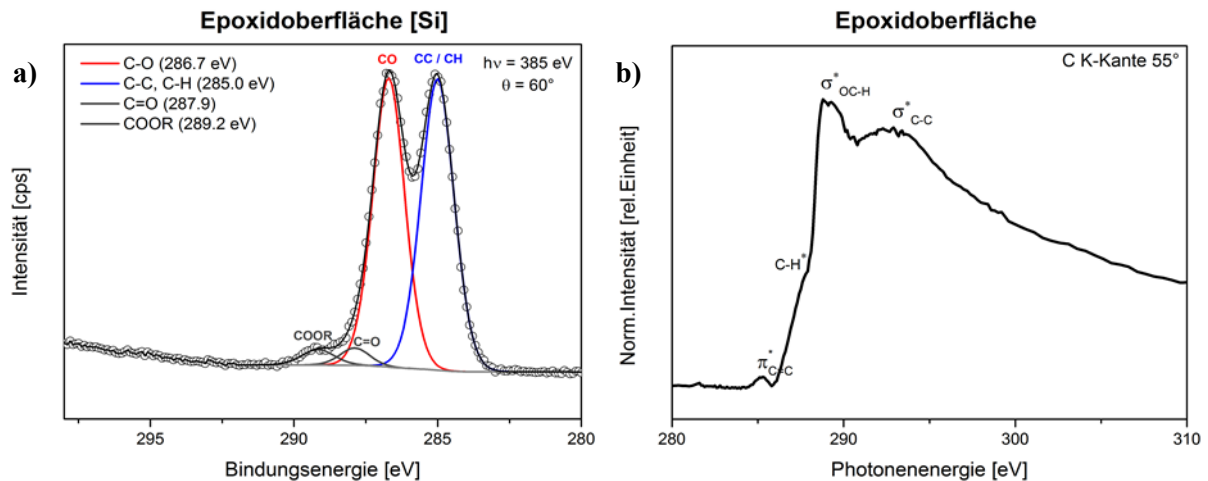


Abbildung 16: XPS C1s Spektrum ($h\nu = 385 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel $= 60^\circ$, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und C K-NEXAFS-Spektrum (55° Einstrahlwinkel) (b) einer GOPTS-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche 1.

Weitere Komponenten sind ebenfalls auf Verunreinigungen zurückzuführen die während des Funktionalisierungsprozesses entstehen: Komponenten bei 287.9 eV (Carbonyl mit 3.0 Flächen-%) und bei 289.2 eV (COOR mit 2.4 Flächen-%). Die Anwesenheit der Epoxidgruppen auf der GOPTS-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche kann klar nachgewiesen werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Epoxidgruppen gegenüber der für die Analysen notwendigen Röntgenstrahlung nur begrenzt stabil sind. Während der XPS-Messungen an Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen konnte eine Röntgen-induzierte Degradation des Epoxidkomponentenpeaks bei 286.7 eV im C1s Spektrum durch die anregende Röntgenstrahlung beobachtet werden. Nach fünf C1s Scans wurde eine wesentlich geringere Fläche unter diesem Komponentenpeak, d.h. ein Verlust an Epoxidverbindungen registriert (1. Scan: 54 Flächen-% C-O, 40 Flächen-% C-O nach fünf Scans). Aus diesem Grund wurde die Messdauer und somit die Röntgenbestrahlung bei den XPS-Untersuchungen von Epoxid-funktionalisierten Oberflächen so kurz wie möglich gehalten und nur 2 bis maximal 3 Scans gemessen. Durch diese Verringerung der Mess- bzw. Bestrahlungsdauer ist es möglich, das Epoxid spektroskopisch mit vertretbarem Fehler ($\sim 5 \%$) zu bestimmen.

Neben der Messung von XP Spektren konnten am Speicherring BESSY II auch NEXAFS-Spektren aufgenommen werden. Die Abbildung 16b zeigt das Spektrum der Kohlenstoff-K-Kante bei einem Einstrahlwinkel von 55° . Das Spektrum verzeichnet eine CH^* -Resonanz zwischen 287.5 und 287.8 eV, welche die aliphatische Kette des Epoxid-Moleküls repräsentiert. Die σ^* -Resonanzstruktur um 289 eV lässt sich den C-O-Funktionalitäten der Epoxidgruppe zuordnen. Der Vergleich mit Literaturergebnissen^[231] bestätigt, dass diese beobachteten σ^* -Resonanzen zur Epoxidfunktion der GOPTS-Oberfläche gehören.

4.3 Derivatisierung von Epoxidoberflächen

Durch die Funktionalisierung von Oberflächen mit Epoxidgruppen soll die Basis für weitere Modifizierungsschritte geschaffen werden. Dabei sollen die Epoxidgruppen als Ankerpunkte für eine kovalente Kopplung von Molekülen, z.B. Mono- und Polysacchariden, dienen. Zur Kopplung solcher Moleküle sind Methoden zu favorisieren, die zu stabilen Bindungen führen. In den folgenden Abschnitten werden Reaktionen zur Kopplung an Epoxid-funktionalisierte Oberflächen sowie die Zugänglichkeit der Epoxidgruppen bezüglich dieser Reaktion behandelt.

Im Folgenden wurde die Bestimmung des für den Aufbau von Microarrays wichtigen Parameters „Epoxidgruppendichte auf Siliziumwaferoberfläche“ mittels zweier unabhängiger Verfahren durchgeführt. Zur qualitativen und quantitativen Analyse von Epoxidgruppen wurde zuerst Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) als Markermolekül verwendet. Der entsprechende Markierungsvorgang der Epoxidgruppen mit TFAA ist in Abbildung 17 dargestellt (Oberfläche 2).

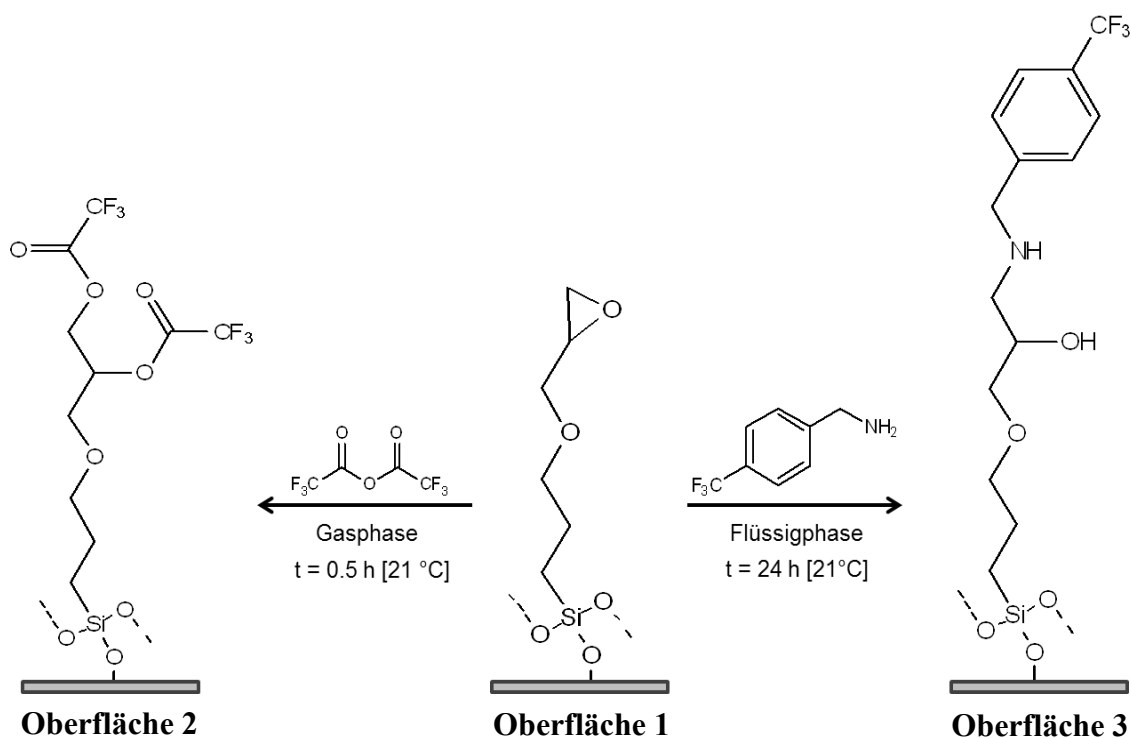


Abbildung 17: Reaktion von TFAA und TFMBA mit Epoxid-Gruppen auf Siliziumoberflächen.

Die Derivatisierung mit TFAA dient der Bestimmung der reaktiven Epoxidgruppen. In der einschlägigen Literatur wird diese Umsetzung mit TFAA als quantitativ dargestellt^[180-181, 232]. Das zweite Verfahren nutzt die aminierte Verbindung TFMBA (Oberfläche 3). TFMBA dient hier als Modellverbindung für ein „proof-of-principle“ Experiment. Später wird die Immobilisierung von Saccharidmolekülen mit einem Aminolinker an Epoxid-funktionalisierten Oberflächen untersucht. Grundsätzlich weist die Epoxidkomponente eine hohe Reaktivität gegenüber primären und sekundären Aminogruppen auf. Der Verlauf der

Reaktion am Beispiel einer Epoxid-funktionalisierten Oberfläche ist ebenfalls in Abbildung 17 dargestellt.

Mithilfe der beschriebenen chemischen Derivatisierung wird über die idealerweise selektive, möglichst schnell und vollständig ablaufende Reaktionen in der quantitativen XPS eine funktionelle Gruppe, hier die Epoxidgruppe, so umgesetzt, dass ein bisher nicht vorhandenes Element im Spektrum auftritt und somit als quantitativer Marker fungiert. TFAA bzw. TFMBA, als Markermoleküle besitzen CF_3 -Gruppen, die in der quantitativen XPS zur Bestimmung von Epoxidgruppen genutzt werden können. Den beiden Marker-Reaktionen liegen unterschiedliche Verfahrensweisen zugrunde: Die Immobilisierung an Epoxid-funktionalisierten Oberflächen mit TFAA in der Gasphase und mit TFMBA in flüssiger Phase. Beide Verfahrensweisen sollen miteinander verglichen werden.

4.3.1 Derivatisierung mit TFAA für die Quantifizierung

Die Experimente zur Derivatisierung von Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen mit fluorhaltigen Reagenzien wurden durchgeführt, um die Reaktivität der Epoxidgruppen mittels XPS-Analyse zu bestimmen (Abbildung 17, Oberfläche 2).

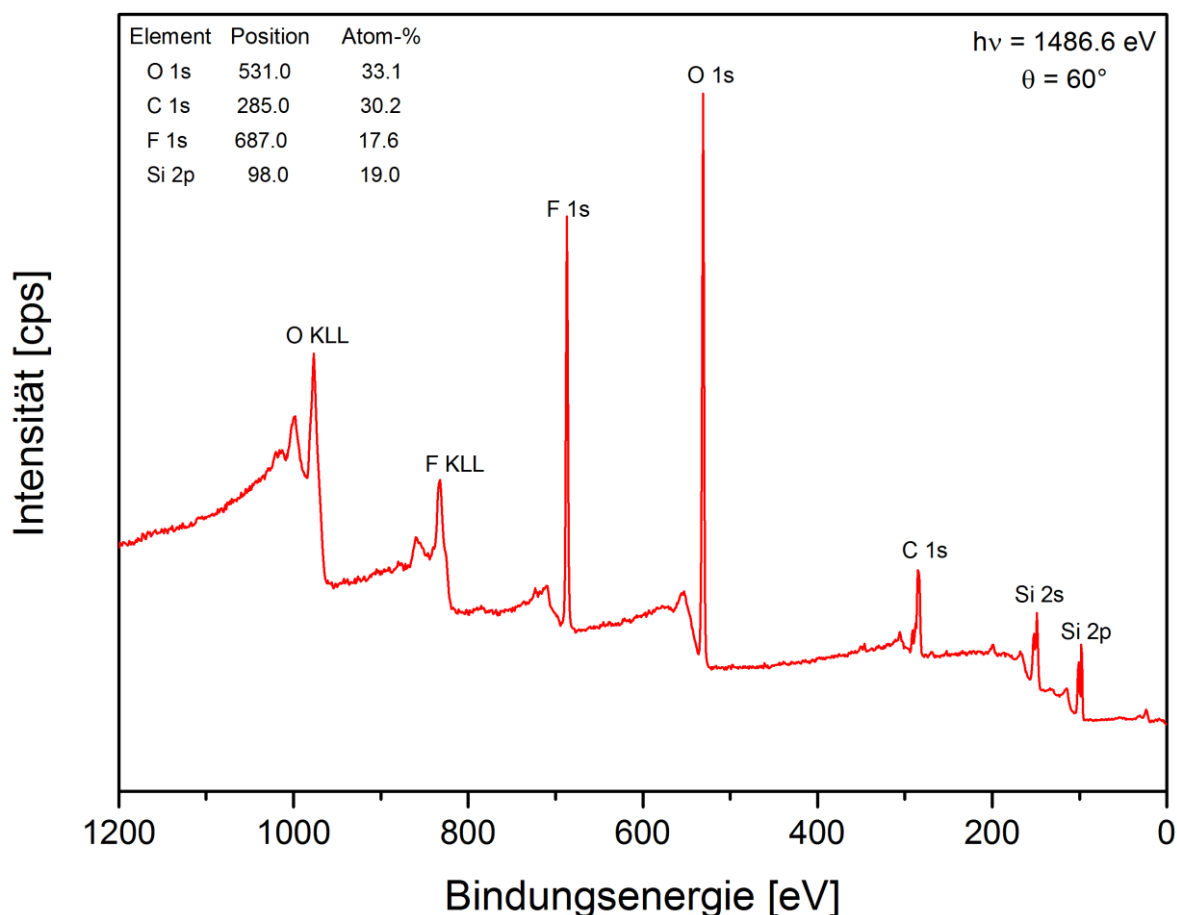


Abbildung 18: XPS Übersichtsspektrum einer mit TFAA derivatisierten GOPTS-Oberfläche 2 (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).

Die CF_3 -Gruppen der TFAA-Moleküle können in zweifacher Weise zur Quantifizierung benutzt werden, einerseits liefert der Komponentenpeak der CF_3 -Gruppe im hochaufgelösten

C1s Spektrum den Marker und andererseits wird das entsprechende F1s Signal im XPS Übersichtsspektrum als Marker genutzt und quantifiziert (s. Abbildung 18).

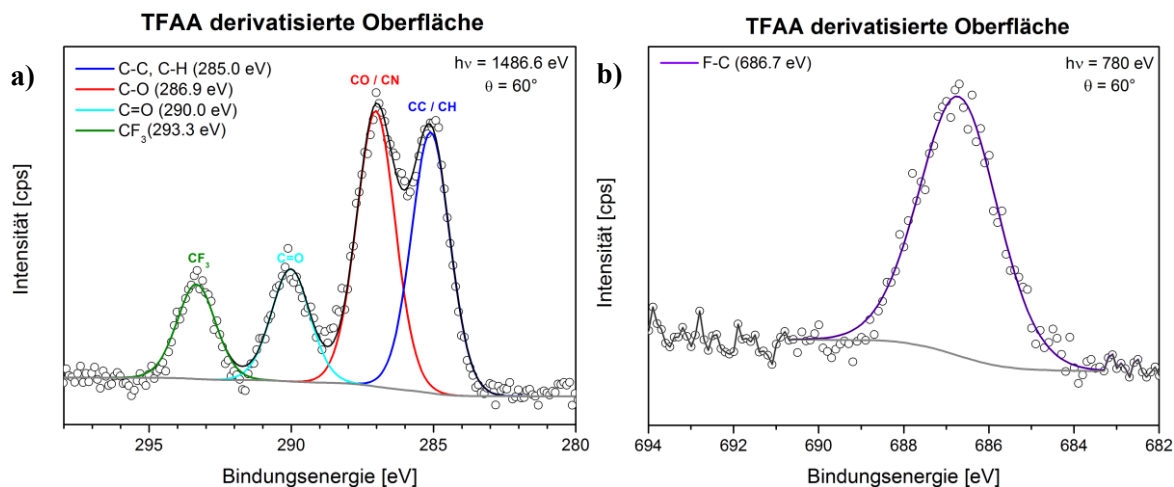


Abbildung 19: Hochauflöste Synchrotron XPS C1s (a) und F1s (b) Spektren einer TFAA derivatisierten GOPTS-Oberfläche 2 (hν = 385 eV und 780 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1).

Nach der Derivatisierung kann das C1s Spektrum (Abbildung 19a) einer TFAA derivatisierten GOPTS-Oberfläche durch Beiträge von sauerstoffhaltigen Kohlenstoffspezies (C-O, C=O) und fluorhaltigen Kohlenstoffspezies (CF₃) beschrieben werden: Einer Komponente bei 290.0 eV, die auf C=O-Gruppen hindeutet (türkise Kurve) und eine Komponente bei 293.3 eV, welche die CF₃-Gruppe repräsentiert (grüne Kurve). Daraus lässt sich ableiten, dass das TFAA unter den gewählten Reaktionsbedingungen, als Ester gebunden wird.

Weiterhin wurde der Umsatz der TFAA-Moleküle mit allen reaktiven GOPTS Epoxidgruppen auf der Siliziumwaferoberfläche ermittelt. Dazu wurde die CF₃-Komponente im hochauflösten Kohlenstoffspektrum genutzt, um die Immobilisierungseffizienz der TFAA-Moleküle an der Epoxidoberfläche zu berechnen. Für die Berechnung wurde die gefittete relative CF₃-Komponentenfläche mit der für eine vollständig umgesetzte Oberfläche stöchiometrisch zu erwartenden ins Verhältnis gesetzt (Gleichung 1). Auf diese Weise wurde der Umsatz der TFAA-Moleküle mit der Epoxidoberfläche abgeschätzt.

$$X = \frac{CF_{3,exp.}}{CF_{3,stoich.}} * 100\% \quad (1)$$

Die hier aufgeführte Verfahrensweise wird in dieser Arbeit auf weitere Immobilisierungsreaktionen mit Markermolekülen, die eine CF₃-Gruppe besitzen, angewandt.

Oberfläche	Relative Peakfläche [%] der C1s Komponenten*									Ausbeute [%]
	Experimentell					Stöchiometrie				
	CC/CH	C-O (C-N)	C=O	CF ₃	C _{contam.} (COOR)	CC/CH	C-O (C-N)	C=O	CF ₃	
Epoxid (1)	48.4	46.4	3.0	–	2.4	33.3	66.7	–	–	
TFAA (2)	28.3	43.3	15.7	12.8	–	20	40	20	20	65
TFMBA (3)	63.6	31.0	–	3.9	1.5	57.2	35.7	–	7.1	55

* Synchrotron XPS (385 eV)

Tabelle 2a: Theoretische stöchiometrie Verhältnisse und aus XPS ermittelte relative Peakflächen der C1s Komponenten im hochaufgelösten XPS Spektrum von TFAA derivatisierten bzw. TFMBA derivatisierten Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen.

Der Vergleich zwischen den gemessenen Werten und der Stöchiometrie des TFAA-Moleküls führt zu einem Umsatz von ~65% (Tabelle 2a). Ein Fluorsignal bei 686.7 eV im hochaufgelösten F1s Spektrum und im Übersichtsspektrum bestätigen, dass TFAA mit der Epoxid-funktionalisierten Oberfläche reagiert hat (Abbildung 18, 19b, Tabelle 2b). Weiterhin wurde der Umsatz der TFAA-Moleküle anhand der relativen Intensität [At%] des Fluorsignals im XPS-Übersichtsspektrum ermittelt. Für die Berechnung wurde das Fluorsignal mit des der stöchiometrisch für eine vollständig immobilisierte Oberfläche zu erwartenden ins Verhältnis gesetzt. Der stöchiometrische Wert wurde durch das Verhältnis der Anzahl der Fluoratome und der Anzahl der gesamten Atome im Molekül, mit Ausnahme von Wasserstoffatomen, ermittelt (Gleichung 2).

$$X_F = \frac{F}{F + N + C + O + Si} * 100\% \quad (2)$$

Der stöchiometrisch berechnete Wert des Fluors der TFAA-Moleküle auf Epoxidoberflächen beträgt 24 At-%, dies ergibt eine Reaktionsausbeute von ~50% ausgehend vom experimentell ermittelten Fluorwert von 12 At-%. Im direkten Vergleich ist der anhand der CF₃-Komponente im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum berechnete Umsatz höher (~65%). Der niedrigere, aus dem XPS-Übersichtsspektrum ermittelte Wert kann durch das Vorhandensein eines überschätzten Kohlenstoffanteils bedingt durch Kohlenstoff-Kontaminationen begründet werden.

Der Kontaktwinkel steigt erwartungsgemäß nach der Derivatisierung mit TFAA auf ~78° ± 1°. Damit erweist sich die derivatisierte Oberfläche im Vergleich zu Epoxid-funktionalisierten Oberflächen (~54° ± 1°) als hydrophober und bestätigt unabhängig, aber indirekt die erfolgreiche Derivatisierung.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [Atom-%]				WCA [°]
	C	N	O	F	
Epoxid (1)	35.7	–	38.7	–	54
TFAA (2)	22.4	–	32.2	12	78
TFMBA (3)	28.8	0.7	37.3	3.6	64

Tabelle 2b: Elementzusammensetzung von GOPTS-modifizierten, TFAA-derivatisierten und TFMBA-derivatisierten Siliziumwaferoberflächen.

4.3.2 Derivatisierung mit TFMBA als Modell für die Glykananbindung

Eine andere Möglichkeit, GOPTS-Oberflächen mit speziellen Markermolekülen zu versehen, basiert auf der Ringöffnungsreaktion von Epoxiden durch Amine (Abbildung 17, Oberfläche 3). Bei der Derivatisierung mit 4-(trifluormethyl)benzylamin (TFMBA) wird die Idee verfolgt das Markermolekül als Modellamin für die spätere kovalente Immobilisierung von Saccharidmolekülen mit Aminolinker zu nutzen. Das TFMBA-Molekül enthält zwei Atome, die vorher nicht im System vorhanden waren: F und N. Diese stehen als Optionen für die Quantifizierung der Epoxidgruppen auf der Siliziumwaferoberfläche zur Verfügung. Nach der Reaktion mit den primären Aminen des TFMBA-Moleküls bilden sich durch die Ringöffnung ein sekundäres Amin und eine Hydroxy-Gruppe aus. Durch die hohe Nucleophilie des Stickstoffes in einem primären Amin verläuft die Reaktion schnell und mit hohen Ausbeuten. Die Reaktion wird so durchgeführt, dass TFMBA in einem Lösemittel mit der funktionalisierten Substratoberfläche in Kontakt gebracht wird.

Die XPS-Ergebnisse zeigen, dass TFMBA auf der Oberfläche gebunden wird. Das Stickstoffsignal bei 399.5 eV und das Fluorsignal bei 688.8 eV im Übersichtsspektrum stammen eindeutig vom immobilisierten TFMBA-Molekül (Tabelle 2b in Kapitel 4.3.1). Der Umsatz der TFMBA-Moleküle kann sowohl anhand der Fluorkomponente als auch anhand der Stickstoffkomponente im XPS-Übersichtsspektrum ermittelt werden. Für die Berechnung der Stickstoffkomponente wurde die Oberflächenkonzentration von Stickstoff, vermindert auf den prozentualen Anteil der gefitteten Amin-Stickstoffkomponente im hochaufgelösten N1s Spektrum (Abbildung 20), mit dem stöchiometrisch ermittelten Wert für eine vollständig immobilisierte Oberfläche, ins Verhältnis gesetzt. Der stöchiometrische Wert der Stickstoffkomponente wurde durch das Verhältnis der Anzahl der Stickstoffatome und der Anzahl der gesamten Atome im Molekül, mit Ausnahme von Wasserstoffatomen, ermittelt (Gleichung 3).

$$X_N = \frac{N}{N + F + C + O + Si} * 100\% \quad (3)$$

Die hier aufgeführte Berechnung wird im weiteren Verlauf der Arbeit auf weitere Immobilisierungsreaktionen mit Stickstoff als Marker angewandt.

Der theoretisch berechnete Wert des Stickstoffs der TFMBA-Moleküle auf Epoxidoberflächen beträgt 4.1 At-%. Dies ergibt, ausgehend vom experimentell ermittelten Stickstoffwert von 0.7 At-%, eine Reaktionsausbeute von ~17%. Ausgehend vom experimentell ermittelten Fluorwert von 3.6 At-%, ergibt sich eine Reaktionsausbeute von ~29% für einen theoretisch berechneten Wert von 12.5 At-%. Im direkten Vergleich damit ist der unten anhand der CF_3 -Komponente im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum berechnete Umsatz deutlich höher (~55%). Der zu niedrige Stickstoff- bzw. Fluoranteil im XPS-Übersichtsspektrum resultiert, wie auch schon bei der TFAA Derivatisierung, aus dem Vorhandensein von Kohlenstoff-Kontaminationen.

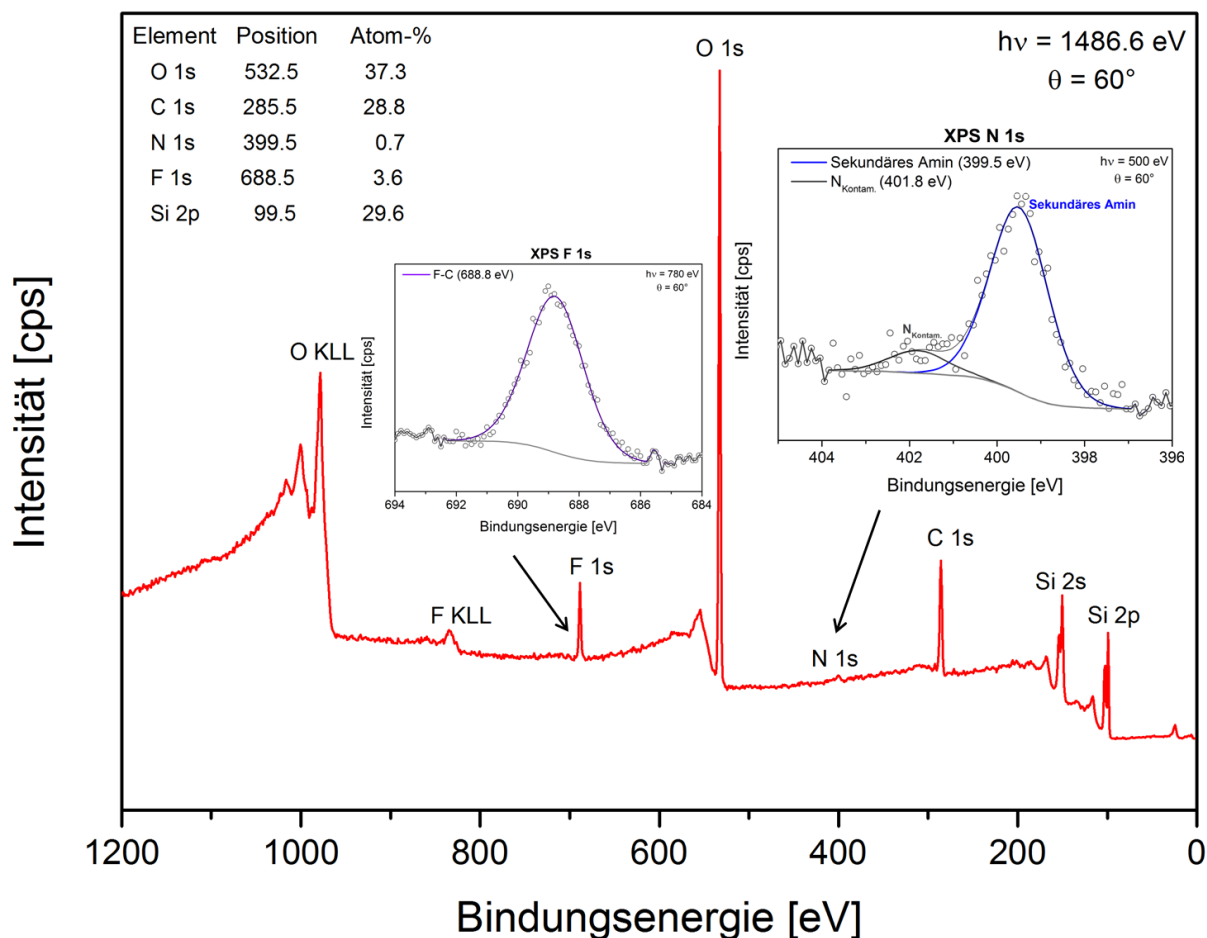


Abbildung 20: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780 \text{ eV}$ und 500 eV , HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) einer TFMBA derivatisierten GOPTS-Oberfläche.

Neben dem Übersichtsspektrum wurden von den relevanten Elementen Kohlenstoff (C1s), Stickstoff (N1s) sowie Fluor (F1s) hochaufgelöste Detailspektren aufgenommen (Abbildungen 20 und 21). Dabei finden sich in den Stickstoff- und Fluor-Spektren jeweils Komponentenpeaks, die mit HN-C bzw. CF_3 -Funktionalitäten des gebundenen TFMBA-Moleküls interpretiert werden (Abbildung 20).

Im hochaufgelösten C1s Spektrum lässt sich die C-C-Komponente (Abbildung 21a) bei 285.0 eV sowohl den Epoxideinheiten als auch den Phenyleinheiten des TFMBA zuordnen. Zudem erfährt erwartungsgemäß die Kohlenstoffspezies C-O/C-N bei 286.5 eV nach der

Immobilisierung mit TFMBA eine relative Abschwächung im Vergleich zur Epoxid-funktionalisierten GOPTS-Siliziumwaferoberfläche.

Weiterhin findet sich im C1s-Spektrum der derivatisierten Oberfläche die CF₃-Spezies bei 292.8 eV. Entsprechend Gleichung 1 kann damit mit gemessenen relativen Flächen der CF₃-Komponente (3.9 Flächen-%) und der erwarteten Stöchiometrie (7.1 Flächen-%) ein Umsatz von ~55% errechnet werden (Tabelle 2a in Kapitel 4.3.1).

Eine unabhängige Beobachtung für die Derivatisierung liefert das NEXAFS-C-Kantenspektrum der TFMBA derivatisierten Oberfläche, hier auf der Grundlage des Nachweises der konjugierten Doppelbindungen im aromatischen System für die diese Methode sehr empfindlich ist. Im, in Abbildung 21b, gezeigten Spektrum der TFMBA derivatisierten Oberfläche sind alle zu erwartenden Signale zu finden.

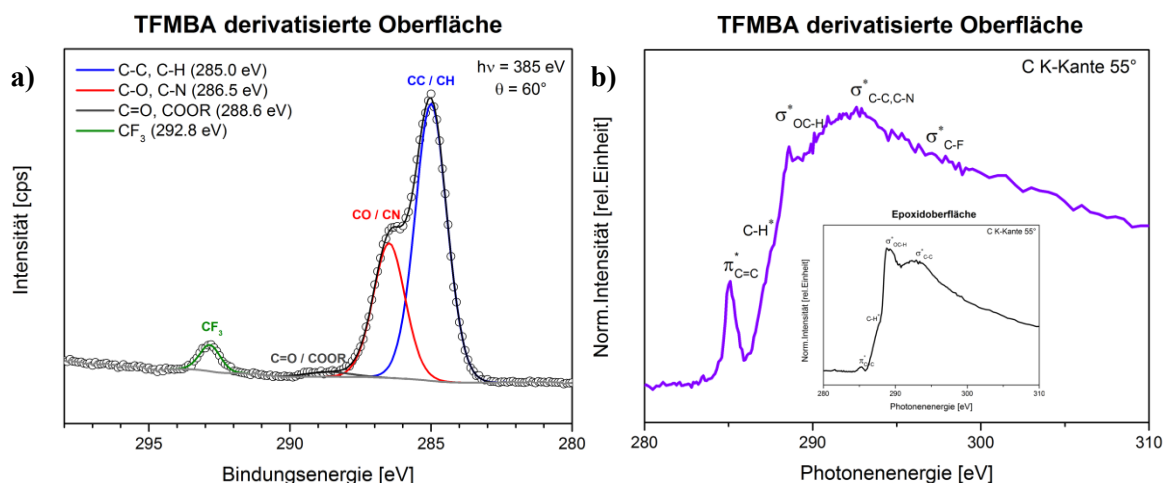


Abbildung 21: Hochauflöstes XPS C1s Spektrum ($h\nu = 385 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und C K-Kanten-NEXAFS-Spektrum (Spektrum der nicht derivatisierten Epoxidoberfläche 1 zum Vergleich eingefügt) (b) einer TFMBA derivatisierten GOPTS-Oberfläche 3.

Um 288.6 eV sind die Resonanzen der C1s - σ^* Übergänge der Elektronen für den Kohlenstoff der C-O und C-C Epoxideinheiten im Spektrum zu erkennen^[233_163]. Weiterhin verzeichnet das Spektrum eine CH*-Resonanz zwischen 287.5 und 287.8 eV, die sich der aliphatischen Kette des Epoxid-Moleküls zuordnen lässt^[234_153]. Von besonderer Bedeutung für den Nachweis der Phenyleinheiten des TFMBA-Moleküls ist der Bereich um 285 eV, welcher die C1s π^* -Resonanz repräsentieren^[234, 235_153, 164]. Das Signal ist auf der derivatisierten Epoxidoberfläche stark ausgeprägt.

Der Kontaktwinkel steigt nach der Derivatisierung mit TFMBA von $\sim 54^\circ \pm 1^\circ$ (Epoxidoberfläche) auf $\sim 64^\circ \pm 1^\circ$. Der im Gegensatz zur TFAA derivatisierten Epoxidoberfläche vergleichsweise geringere Anstieg des Kontaktwinkels, ist konsistent mit der Erwartung, dass TFMBA pro Moleküleinheit nur eine CF₃-Gruppe besitzt im Gegensatz zum TFAA-Molekül mit je zwei CF₃-Gruppen pro Moleküleinheit.

4.3.3 Zusammenfassung

Im Kapitel 4.3 wurde dargestellt, wie durch die unabhängigen oberflächenanalytischen Methoden XPS, NEXAFS und Kontaktwinkelmessung klare qualitative Beobachtungen für die erfolgreiche Derivatisierung von Epoxidoberflächen erbracht werden können. Es wurden verschiedene, auf XPS mit Derivatisierung basierende Verfahrensweisen für eine Quantifizierung der für eine kovalente Immobilisierung verfügbaren Epoxidgruppen auf Siliziumwaferoberflächen getestet. Darüber wurden Ausbeuten für die Derivatisierungsreaktionen abgeschätzt.

	TFAA	TFMBA
	Derivatisierungsausbeute	Derivatisierungsausbeute
Aus Übersicht [F] (Gl.2)	~50 %	~29 %
Aus Übersicht [N] (Gl.3)	-	~17 %
Aus CF₃ Komp. in hochaufgel. C1s	~65 %	~55 %

Tabelle 3: TFAA- und TFMBA Derivatisierung zur Abschätzung der Ausbeute (=verfügbare Epoxidgruppen) ausgehend vom Fluor- und Stickstoffwert im XPS-Übersichtsspektrum und anhand der CF₃-Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum.

Es wurde gezeigt, dass für die kovalente Immobilisierung zur Verfügung stehenden Epoxidgruppen eine unterschiedliche Reaktivität der Markermoleküle TFAA und TFMBA aufweist, was sich in unterschiedlichen Reaktionsausbeuten widerspiegelt (Tabelle 3). Die Reaktivität der TFMBA-Moleküle (55 % Reaktionsausbeute aus CF₃-Komponente) ist hinsichtlich der zur Verfügung stehenden Epoxidgruppen deutlich niedriger als die Reaktivität der TFAA-Moleküle (65 % Reaktionsausbeute aus CF₃-Komponente). Die deutlich niedriger errechneten Ausbeuten anhand der Fluor- bzw. Stickstoffkomponente im XPS-Übersichtsspektrum resultieren vermutlich aus dem Vorhandensein von Kohlenstoff-Kontaminationen.

Ein Grund für niedrige Reaktionsausbeuten im Falle der TFMBA Derivatisierung könnte in der Hydrolyse der zur Verfügung stehenden reaktiven Epoxidgruppen liegen. Epoxide neigen bei höheren Temperaturen bzw. bei höherer Luftfeuchtigkeit zur Hydrolyse. Einige reaktive Epoxidgruppen könnten durch Temperatur- bzw. Luftfeuchtigkeits- bedingte Hydrolyse verloren gegangen sein.

Die in Kapitel 4.3 erlangten Kenntnisse der spektralen Features von TFMBA derivatisierten Epoxidoberflächen sind bedeutend für die Charakterisierung der Anbindung Amino-funktionalisierter Glykane an Epoxidoberflächen im Kapitel 4.4.

4.4 Oberflächenanalytische Charakterisierung von Modell-Glykan-Oberflächen

Nach der Beobachtung der erfolgreichen Derivatisierung der Epoxidoberflächen auf Siliziumwafern mit dem Modellamin 4-(trifluormethyl)benzylamin (TFMBA) mit den Methoden XPS, NEXAFS und Randwinkelmessung soll nun die auf der gleichen Reaktion beruhende kovalente Anbindung von Modellglykanen auf Epoxidoberflächen untersucht werden. Dieses Modell ist hilfreich für das Verständnis der Ergebnisse der späteren Charakterisierung von anwendungsnahen Zucker-basierten Microarrays auf Glassubstraten (Kapitel 4.6). Als Modelle werden Mono-, Oligo- und Polysaccharide mit einem Aminolinker verwendet.

Für den Nachweis immobilisierter Glykane wird nun auch die Flugzeit-Sekundärionen-Massen-Spektrometrie (ToF-SIMS) benutzt.

4.4.1 Immobilisierung von Glucosamin*HCl (Glc-NH₂*HCl)

Nach der Immobilisierung der Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen mit dem TFMBA-Modellamin wird nun die Immobilisierung von aminierten Monosacchariden untersucht. In diesem Abschnitt steht die Charakterisierung von Glucoseamin auf Epoxidoberflächen im Mittelpunkt (Abbildung 22, Oberfläche 4).

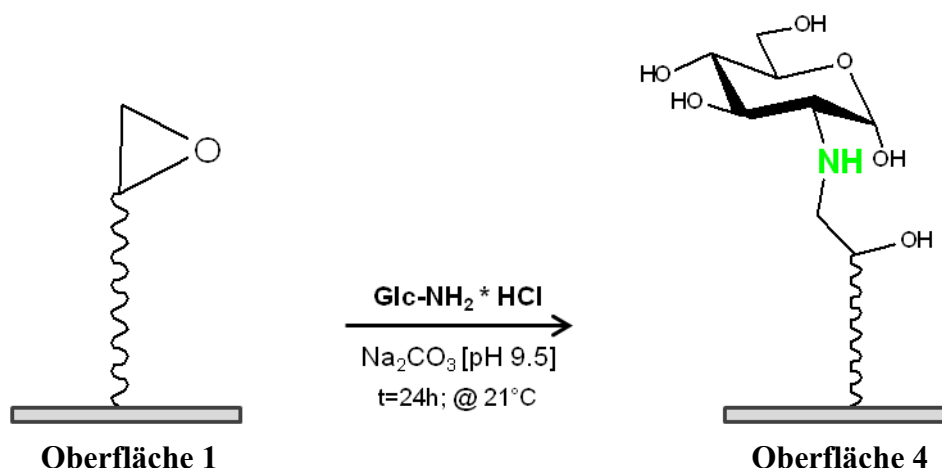


Abbildung 22: Reaktion von Glc-NH₂*HCl mit Epoxidgruppen auf Siliziumoberflächen.

Als Indikator für die realisierte Amin-Anbindung des Glucoseamins an Epoxid-funktionalisierte Siliziumwaferoberflächen dient das XPS N1s-Signal. Stickstoff, als Heteroatom, wird hier als quantitativer Marker für eine erfolgreiche Glucoseanbindung genutzt. Diese Stickstoffatome in sekundären Aminen lassen sich im hochaufgelösten Stickstoff XP-Spektrum bei einer Bindungsenergie von 399.7 eV (mit 93.1 Flächen-%) beobachten (Abbildung 23b). Das Spektrum verzeichnet neben der produktspezifischen NH-Komponente, einen relativ niedrigen Anteil einer Stickstoffkontamination bei 402.1 eV (mit 6.9 Flächen-%).

Neben den XPS N1s Spektren wurden auch hochaufgelöste C1s-Spektren von den Glucose-Oberflächen aufgenommen (Abbildung 23a, Tabelle 4a).

Neben den C-C/C-H- und C-O/C-N Komponenten bei 285.0 eV und 286.6 eV, zeigt das C1s Spektrum eine Komponente bei 287.8 eV, die mit der Acetal-Gruppe des Glucosamins interpretiert wird. Der überhöhte Anteil der C-C-Komponente im XPS C1s Spektrum ist mit einer Kontamination zu erklären.

Eine genaue Berechnung der Immobilisierungseffizienz anhand der für Glucose charakteristischen Acetal-Komponente bei 287.8 eV wird aufgrund der überlagerten C=O-Komponente (287.8 eV) erschwert. Der Reaktionsumsatz lässt sich dennoch anhand der Acetalkomponente abschätzen wenn der Beitrag der C=O/COOR Kontaminationen, wie gemessen für die Epoxidoberfläche (vgl. 4.3), berücksichtigt wird.

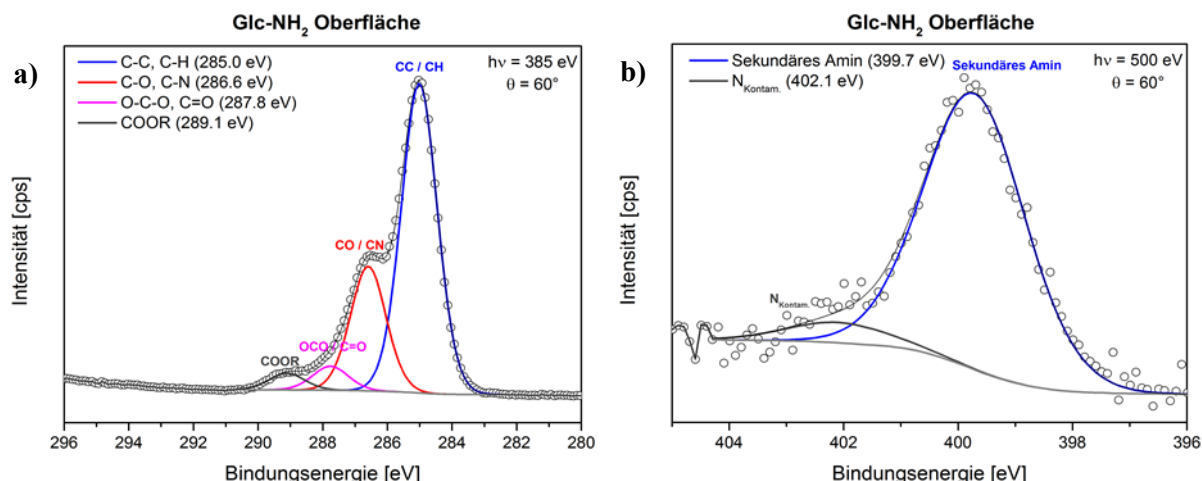


Abbildung 23: Hochaufgelöste Synchrotron XPS C1s- (a) und N1s-Spektrum (b) einer Glc-NH₂-immobilisierten Oberfläche (hν = 385 eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm).

Das Auftreten der kohlenstoffhaltigen Kontaminationen auf der Glucoseoberfläche lässt sich durch den extrem hydrophilen Charakter dieser Oberflächen erklären. Sie können z. B. leicht unvermeidbare Kohlenstoffverbindungen aus der Luft (Laboratmosphäre) adsorbieren. Es wird hier geschlussfolgert, dass anhand der C1s-Spektren keine eindeutige Beobachtung für eine erfolgreiche Glucose-Immobilisierung hergeleitet werden kann.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#]				C1s Komponenten der Peakfläche [*]			
	[Atom-%]				[Flächen-%]			
	C	N	O	Si	CC/CH	CO/CN	O-C-O/C=O	C _{Cont.}
Epoxid (1)	35.7	-	38.7	25.6	48.5	46.1	3.0	2.4
Glc-NH ₂ (300 mM) (4)	28.5	1.2	43.1	27.2	65.2	26.2	5.0	3.5

^{*}Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al Kα (1486.6 eV)

Tabelle 4a: XPS Elementzusammensetzungen und C1s Komponenten-Peakflächen von Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen nach der Immobilisierung von Glc-NH₂.

Kontaktwinkelmessungen wurden vor und nach der Immobilisierung mit Glucosamin-Molekülen an Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen durchgeführt. Der Kontaktwinkel nimmt nach der Immobilisierung mit $\text{Glc-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ von $\theta \sim 54^\circ \pm 1^\circ$ (Epoxidoberfläche) auf $\theta \sim 41^\circ \pm 1^\circ$ deutlich ab. Der im Vergleich zu TFSA-Oberflächen ($\theta \sim 78^\circ \pm 1^\circ$) deutlich niedrigere Wert weist auf eine hydrophile Oberfläche und damit auf eine erfolgreiche Immobilisierung des Glucosamins hin. Durch die OH-Endgruppen der immobilisierten Glucosamin-Moleküle auf der Oberfläche ändern sich die Benetzungseigenschaften der Oberfläche von hydrophob zu hydrophil.

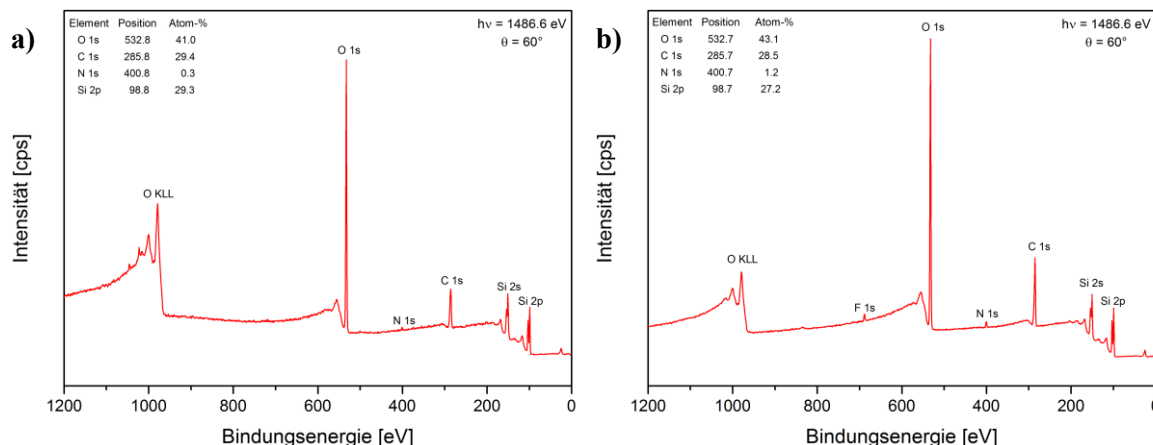


Abbildung 24: XPS Übersichtsspektren einer Glc-NH_2 -immobilisierten Oberfläche mit einer Konzentration von 50 mM (a) und 300 mM (b) ($\text{Al K}\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).

Ein weiteres Ziel war es, die Immobilisierung von Glucosamin-Molekülen im Hinblick auf deren Konzentration in den Reagenzien zu optimieren. Um eine optimale Immobilisierung mit Glucosamin in flüssiger Phase zu erreichen, wurden unterschiedliche Konzentrationen (50 mM / 100 mM / 200 mM / 300 mM / 400 mM) getestet. Bei Benutzung des Stickstoff-Markers zeigt die Immobilisierung der Glucosamin-Moleküle einen deutlichen Trend. Beim Vergleich der Intensität der Stickstoffsignale im XPS-Übersichtsspektrum bei einer Glucosekonzentration von 50 mM und 300 mM liegt die optimale Konzentration bei 300 mM (Tabelle 4b, Abbildung 24). Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Sättigung erreicht wurde, da bei einer Glucosekonzentration von 400 mM kein weiterer Anstieg der Intensität des Stickstoffsignals zu beobachten war.

Der theoretisch berechnete Wert (Gleichung 3 in Kapitel 4.3.2) des Stickstoffs des Glucosamins auf Epoxidoberflächen bei Sättigung beträgt 4.2 At-%, dies ergibt eine Reaktionsausbeute von $\sim 29\%$ ausgehend vom experimentell ermittelten Stickstoffwert von 1.2 At-% (Tabelle 4b).

Monosaccharide (Konz.)	Elementzusammensetzung [#] [Atom-%]				WCA
	C1s	N1s	O1s	Si2p	
Glc-NH ₂ *HCl [50 mM]	29.4	0.3	41.0	29.3	46
Glc-NH ₂ *HCl [100 mM]	27.9	0.7	41.8	29.6	46
Glc-NH ₂ *HCl [200 mM]	29.5	0.9	42.3	27.5	42
Glc-NH ₂ *HCl [300 mM]	28.5	1.2	43.1	27.2	41
Glc-NH ₂ *HCl [400 mM]	28.7	1.2	43.0	27.1	41

[#] Al K α (1486.6 eV)

Tabelle 4b: Elementzusammensetzungen (XPS) von Glucosamin*HCl auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Alternativ wurde zur Abschätzung des Reaktionsumsatzes die Acetal-Komponente (O-C-O) im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum herangezogen. Der theoretische Wert der Acetal-Komponente des Glykan Moleküls Glc-NH₂ auf Epoxidoberflächen beträgt 8%, dies ergibt eine Reaktionsausbeute von 25% ausgehend vom experimentell ermittelten Actal-Wert von 2.0% (abzüglich des C=O Anteils von 3.0% der Epoxidoberfläche). Im direkten Vergleich ist der Reaktionsumsatz anhand der Acetal-Komponente kompatibel mit dem aus der Stickstoff-Komponente ermittelten Wert (29%), ist aber mit einer deutlich höheren Messunsicherheit (Abzug der Kontamination, Peak-Fit-Fehler von ~5 %) belastet.

Der niedrige Reaktionsumsatz lässt sich mit der vergleichsweise niedrigen Reaktivität des Glucosamin*HCl erklären. Glucosamin liegt als HCl Salz vor. Aus diesem Grund ist diese Verbindung nicht so reaktiv wie andere freie Amine. Daher liegt die Vermutung nah, dass die im Experiment verwendete Base nicht stark genug ist, eine vollständige Freisetzung aller Amine aus dem Salz zu ermöglichen.

4.4.2 Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrin als Modellsystem für eine sensorisch ausbeutbare Gast-Wirt-Wechselwirkung

4.4.2.1 Abschätzung der Immobilisierungsausbeute von β -Amino-Cyclodextrin auf Epoxidoberflächen

Nach den Monosacchariden wurden Polysaccharide auf Epoxidoberflächen immobilisiert die als Sondenmoleküle zum Nachweis von Analyten eingesetzt werden können. Hierfür wurde β -Amino-Cyclodextrin (CD-NH₂) ausgewählt und analog zu den Umsetzungen von Glucosamin mit Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen verwendet. Mit Hilfe des Aminolinkers sollte eine kovalente Anbindung des Polysaccharides β -Amino-Cyclodextrin an die Epoxid-funktionalisierte Substratoberfläche erreicht werden (Abbildung 25, Oberfläche 5).

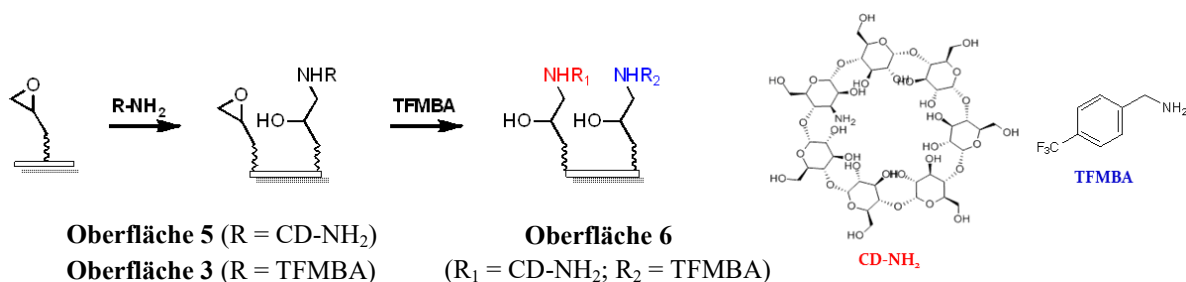


Abbildung 25: Reaktionsschema der Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrin (**R1**) an einer Epoxidoberfläche (Oberfläche 5 und 6) und indirekte Quantifizierung von nicht umgesetzten Epoxidgruppen mit TFMBA (**R2**, Oberfläche 6).

Neben den XPS-Übersichtsspektren (Abbildung 26) wurden hochaufgelöste C1s- und N1s-Spektren aufgenommen. Das gemessene N1s-Spektrum wird mit zwei Komponenten angepasst, die Komponente bei 400.5 eV repräsentiert die neu eingeführten Stickstoffatome (HN-C) des Aminolinkers der Cyclodextrin Moleküle (sekundäres Amin) mit 87.1 Flächen-%, die bei 402.5 eV eine Kontamination mit 12.9 Flächen-%.

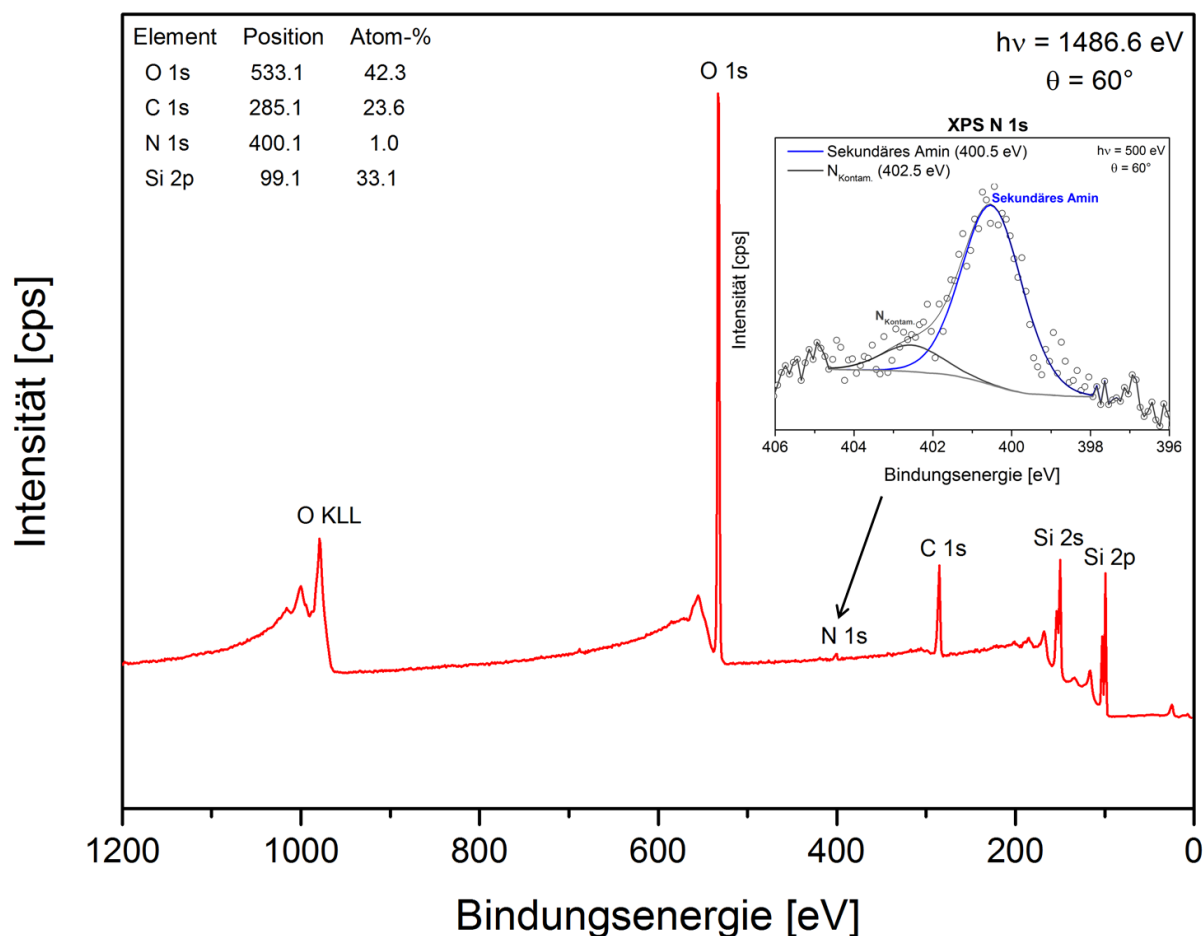


Abbildung 26: XPS Übersichtsspektrum (Al Ka, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöstes Synchrotron XPS N1s Spektrum ($h\nu = 500 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) einer CD-NH₂-immobilisierten Oberfläche 5.

Die theoretisch aus der Stöchiometrie berechnete Oberflächenkonzentration des Stickstoffs der auf der Epoxidoberfläche immobilisierten Cyclodextrin-Moleküle beträgt 1.2 At-%. Damit ergibt sich ausgehend vom experimentell ermittelten Stickstoffwert von 1.0 At-% (Abbildung 26), eine deutliche Beobachtung für die erfolgreiche Immobilisierung und eine Reaktionsausbeute von ~83%. Das hochaufgelöste XPS Kohlenstoffspektrum (Abbildung 27a) der Cyclodextrin-Oberfläche zeigt eine Kontamination durch adsorbierte aliphatische Kohlenstoffspezies (C-C) bei 285.0 eV. Die Acetalgruppen Komponente (O-C-O) des Cyclodextrins wird bei 288.2 eV beobachtet, ist aber wahrscheinlich wieder mit einer Komponente überlagert, die auf eine Carbonyl-Verunreinigung zurückzuführen ist. Weiterhin wird bei 289.4 eV eine ebenfalls auf Verunreinigung beruhende COOR Komponente beobachtet. Diese Verunreinigungen können Residuen des Immobilisierungsprozesses sein, aber auch durch Adsorption von Laboratmosphärenkomponenten erzeugt werden. Die Interpretation der Acetal-Komponente bei 288.2 eV im C1s Spektrum im Sinne eines Nachweises des immobilisierten Cyclodextrins ist deshalb nicht zielführend.

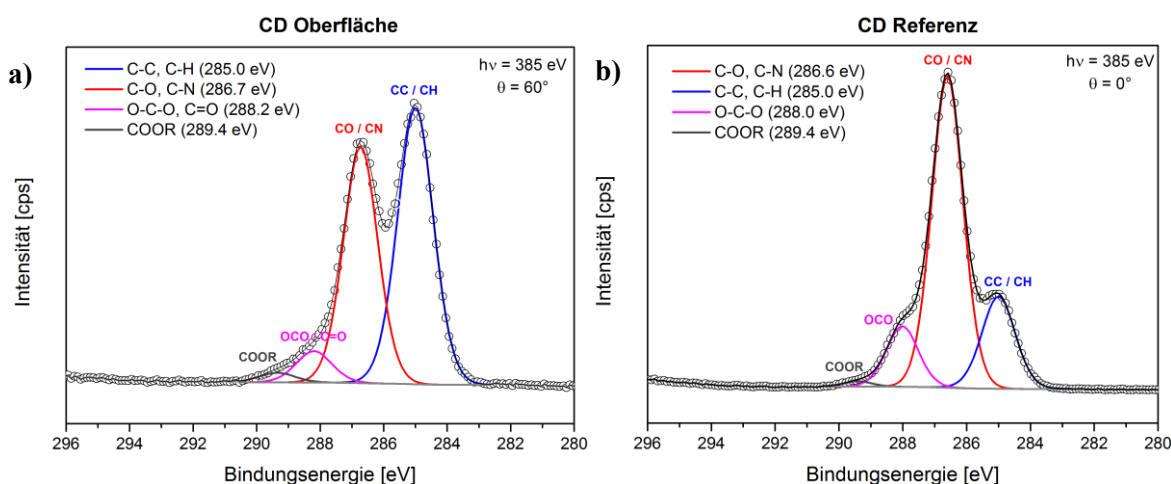


Abbildung 27: Hochaufgelöste Synchrotron XPS C1s Spektren einer CD-NH₂ (CD)-immobilisierten Oberfläche **5** ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) **(a)** und einer Amino-Cyclodextrin-Referenzschicht, die auf einen Siliziumwafer mit spin coating aufgebracht wurde ($h\nu = 385$ eV, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von 1.1 nm) **(b)**.

Zum Vergleich wurden XPS-Übersichtsspektren (Abbildung 26, Anhang 1) und hochaufgelöste C1s-Spektren (Abbildung 27b) einer Amino-Cyclodextrin-Schicht auf Siliziumwafer als Referenz aufgenommen. Für diese CD-NH₂-Referenzprobe wurde eine Stickstoffoberflächenkonzentration von 1.2 At-% bestimmt. Im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum wird die Acetal-Komponente (O-C-O) bei 288.0 eV beobachtet. Dominiert wird das Spektrum von einer Hauptkomponente (C-O) bei 286.6 eV mit 65.4 Flächen-%. Die Komponenten bei 285.0 und 289.4 eV werden C-C/C-H und COOR Funktionalitäten zugeordnet. Der Vergleich der C1s Spektren der immobilisierten β -Amino-Cyclodextrinschicht mit der Referenzschicht verdeutlicht das Kontaminationsproblem im ersten Fall und zeigt, dass hier das hochaufgelöste C1s Spektrum zum eindeutigen Nachweis erfolgreicher Immobilisierung wenig geeignet ist.

Es wurde eine Kontaktwinkelbestimmung nach der Immobilisierung von Cyclodextrin-Molekülen durchgeführt. Durch die hohe Anzahl an freien OH-Gruppen sinkt der Kontaktwinkel im Vergleich zur Epoxidoberfläche ($\theta \sim 54^\circ \pm 1^\circ$) auf den deutlich niedrigeren Wert von $\theta \sim 31^\circ \pm 1^\circ$. Dieser Befund weist auf eine hydrophile Oberfläche und damit indirekt auf eine erfolgreiche Immobilisierung der β -Amino-Cyclodextrin-Moleküle hin.

Auf der Suche nach einer eindeutigen Beobachtung wurde die statische ToF-SIMS eingesetzt. Zunächst wurde eine Cyclodextrin-Referenzschicht auf Siliziumwafer mittels Bi_3^{2+} -Primärionenbeschuss untersucht (Abbildung 28) und anschließend die β -Amino-Cyclodextrin-immobilisierte Oberfläche. Es wurde ein eindeutiger Quasi-Molpeak $[\text{M}+\text{H}]^+$ des aminierten Cyclodextrins bei $m/z = 1134.3933$ den Cyclodextrin-Molekülen gefunden. Die ToF-SIMS Untersuchungen lieferten somit Ergebnisse, die für eine erfolgreiche Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrin auf Epoxidoberflächen sprechen.

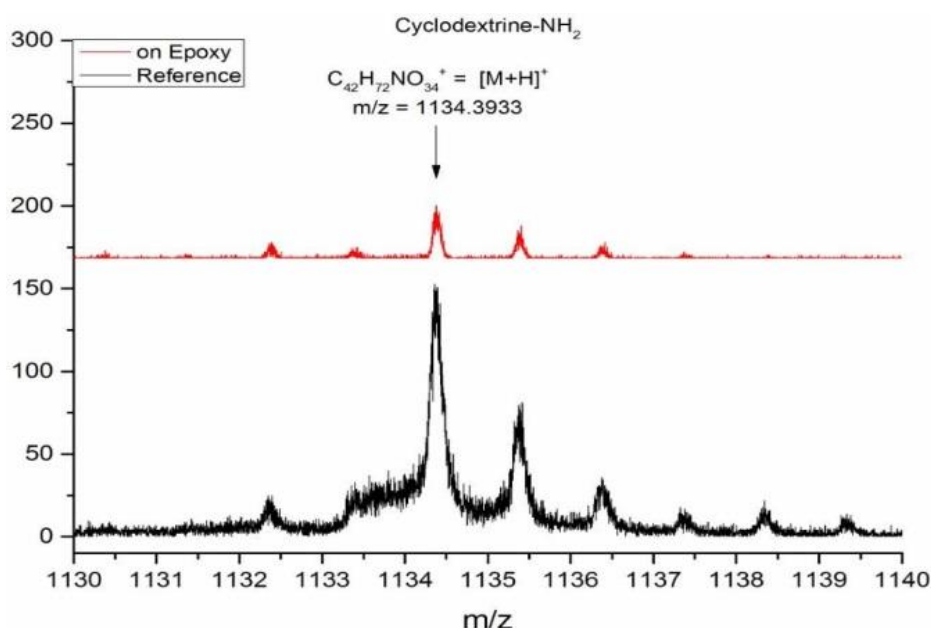


Abbildung 28: Positives Sekundärionen-Massenspektrum (ToF-SIMS) einer β -Amino-Cyclodextrin-immobilisierten Oberfläche. Zum Vergleich wird das Spektrum der CD-NH₂-Referenzschicht, die auf einen Siliziumwafer mit spin coating aufgebracht wurde, gezeigt.

Neben der Quantifizierung der kovalent immobilisierten Cyclodextrin-Moleküle anhand der Stickstoffkomponente durch XPS, dem Nachweis über ein Quasi-Molekülion in der ToF-SIMS und dem indirekten Befund der Kontaktwinkelmessung, soll noch ein weiteres indirektes Quantifizierungsverfahren für immobilisierte Cyclodextrin Moleküle getestet werden.

Mit der Annahme (i) einer bekannten Ausbeute an reaktiven Epoxidgruppen auf der GOPTS-Oberfläche auf dem Siliziumwafer (Kapitel 4.3.2), der begründeten Annahme (ii), dass pro immobilisiertem Cyclodextrin-Molekül eine Epoxidgruppe „verbraucht“ wird und (iii) der Bestimmung der nach der Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrins verbliebenen verfügbaren reaktiven Epoxidgruppen, kann im Sinne einer Schätzung auf die Immobilisierungseffizienz zurückgeschlossen werden. Dazu werden die verbliebenen reaktiven Epoxidgruppen mit TFMBA derivatisiert und quantifiziert. Der entsprechende Quantifizierungsvorgang ist in Abbildung 25 (Oberfläche 6) schematisch dargestellt.

Die Intensität der CF_3 -Gruppe im C1s -Spektrum nach einer Derivatisierung der Epoxidoberfläche mit TFMBA ist aus Kapitel 4.3.2 bekannt. Die Abschätzung der Immobilisierungseffizienz für das β -Amino-Cyclodextrin erfolgt dann auf der Grundlage der Veränderungen der relativen Fläche der CF_3 -Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum.

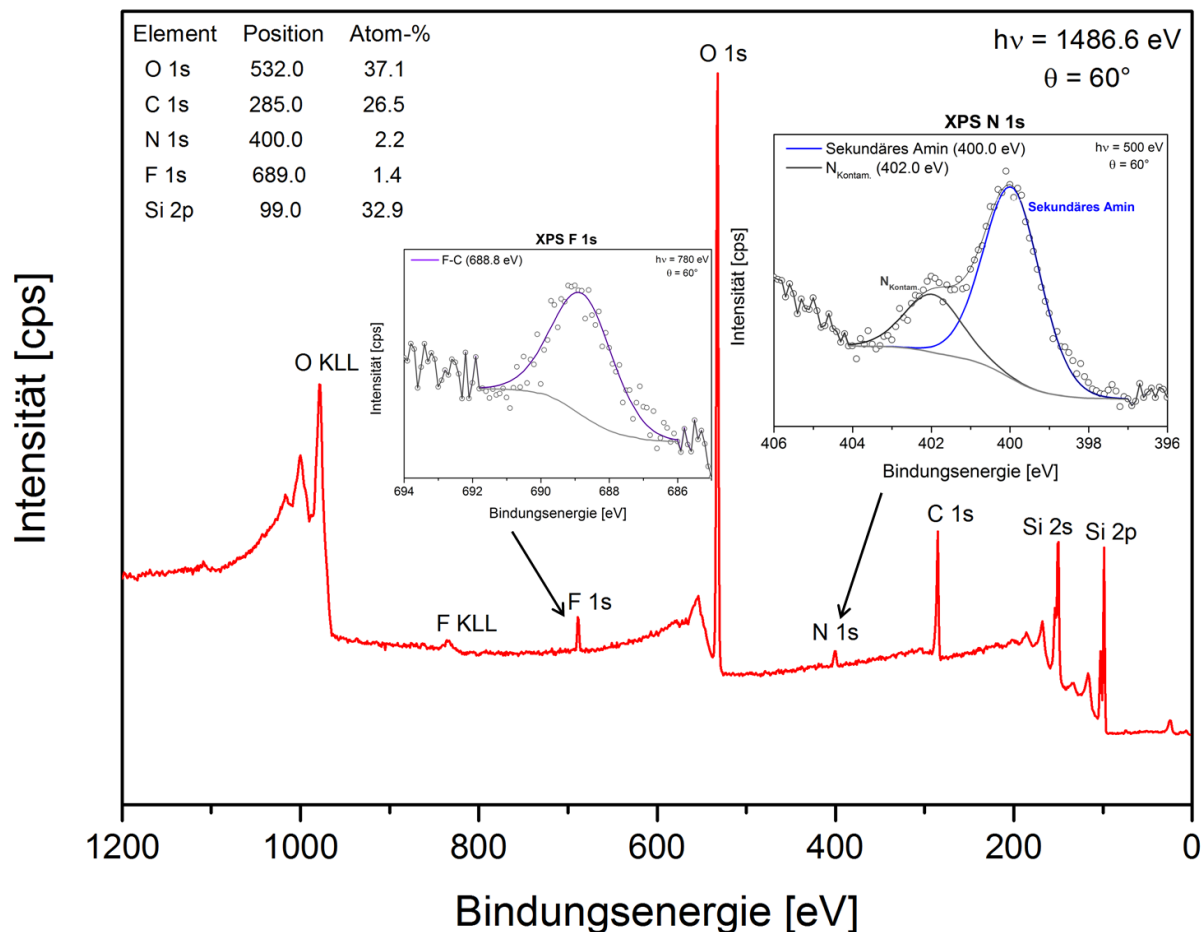


Abbildung 29: XPS Übersichtsspektrum ($\text{Al K}\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780 \text{ eV}$ und 500 eV , HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) einer CD-NH_2 -TFMBA Oberfläche auf einem Epoxid-modifiziertem Siliziumwafer.

Nach der CD-NH_2 -Immobilisierung erfolgt die Markierung der verbliebenen Epoxidgruppen mit TFMBA. Das Fluorsignal bei 688.8 eV im XPS-Übersichtsspektrum stammt eindeutig vom immobilisierten TFMBA-Marker. Weiterhin zeigt das Stickstoffsignal bei 400.0 eV im Übersichtsspektrum einen Anstieg des Stickstoffgehalts auf 2.2 At-\% im Vergleich zur immobilisierten CD-NH_2 -Probe (1.0 At-\%) (Abbildung 29, Tabelle 6). Es wurden hochaufgelöste Detailspektren von Fluor, Stickstoff und Kohlenstoff aufgenommen (Abbildung 29, 30a). Das F1s Spektrum wird durch eine einzelne Komponente bei 688.8 eV bestimmt. Das Stickstoffspektrum der CD-TFMBA -Oberfläche wurde mit zwei Komponenten angepasst. Das hochaufgelöste Stickstoffspektrum (Abbildung 29) verzeichnet, neben der sekundären Amin-Komponente bei 400.0 eV (76.8 Flächen-\%), einen Kontaminationspeak bei 402.0 eV (23.3 Flächen-\%).

Im hochaufgelösten C1s Spektrum nimmt die Intensität der C-C-Komponente bei 285.0 eV bedingt durch die eingeführten aromatischen Bestandteile der TFMBA-Moleküle deutlich zu. Die zusätzlich bei 292.9 eV auftretende Bande ist eindeutig der CF₃-Gruppe des TFMBA-Markers zuzuordnen.

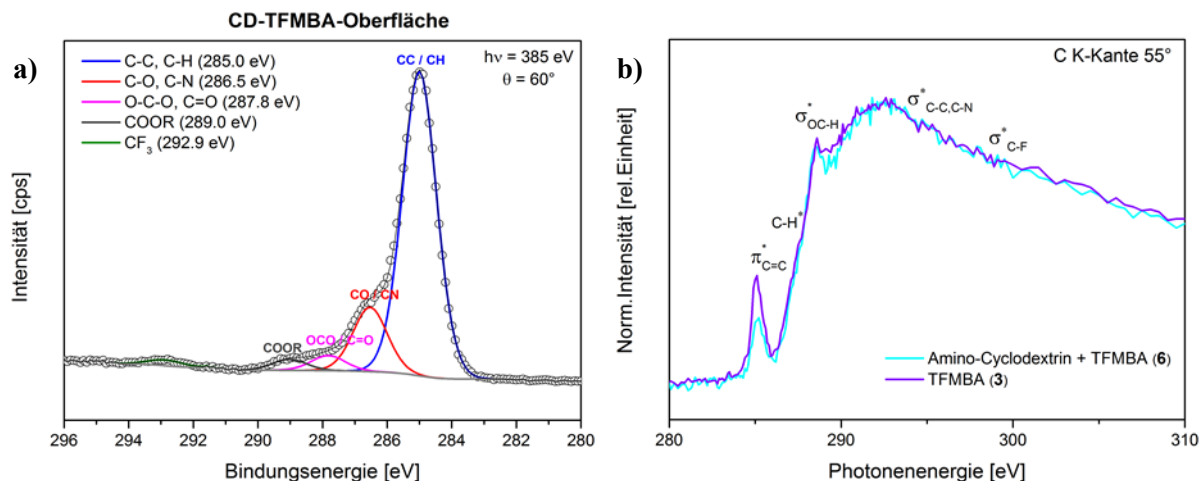


Abbildung 30: Hochaufgelöstes XPS C1s Spektrum einer Epoxidoberfläche auf der sukzessiv CD-NH₂ und TFMBA immobilisiert wurde ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und Vergleich der C K-NEXAFS Spektren von TFMBA- bzw. CD-NH₂ – und TFMBA immobilisierten Epoxidoberflächen auf Siliziumwafer (b).

Für die Derivatisierungsreaktion der Epoxidoberfläche **3** mit TFMBA ist in Kapitel 4.3.2 eine Ausbeute von 55% bestimmt worden. Für die an der Epoxidoberfläche **5** immobilisierten β -Amino-Cyclodextrin Moleküle und nachfolgender Marker-Reaktion mit TFMBA mit den verbliebenen reaktiven Epoxidgruppen ergibt sich eine Ausbeute von ca. 21%.

Oberfläche (Nr.)	C1s* Komponenten, relative Peakfläche [%]				
	CC/CH	CO/CN	O-C-O/C=O	C _{contam.}	CF ₃
Epoxid (1)	48.5	46.1	3.0	2.4	–
β -Amino-Cyclodextrin (5)	50.7	41.8	5.7	1.8	–
TFMBA (3)	63.6	31.0	–	1.5	3.9
β -Amino-Cyclodextrin-TFMBA (6)	75.9	16.1	3.8	2.8	1.5
β -Amino-Cyclodextrin-Ferrocen (7)	75.0	15.8	5.7	3.5	–

* Synchrotron XPS (385 eV)

Tabelle 5a: Mittels hochaufgelöster XPS ermittelte relative Peakflächen für C1s Komponenten bestimmt in Experimenten an der Siliziumwaferoberfläche, die an der β -Amino-Cyclodextrin an Epoxidgruppen immobilisiert wurde (Epoxidoberfläche **1** als Referenz).

Aus diesen Umsätzen lässt sich durch Differenzbildung im Sinne einer Obergrenze die Immobilisierungseffizienz für β -Amino-Cyclodextrin auf der Epoxidoberfläche abschätzen (vgl. Tabelle 5). Es ergibt sich so ein 34%iger Umsatz.

NEXAFS Untersuchungen dienten auch hier der Verifizierung einer Immobilisierung von TFMBA auf der Epoxidoberfläche **6** mit immobilisiertem β -Amino-Cyclodextrin. Wie in Abbildung 30b dargestellt wird die C1s π^* -Resonanz des TFMBA Ringes wieder als quantitativer Marker benutzt. Im Vergleich zur TFMBA immobilisierten Oberfläche **3** (Kapitel 4.3.2) nimmt die Intensität der π^* Resonanz im Falle der sukzessiven CD-NH₂ und TFMBA Immobilisierung (Oberfläche **6**) auf der Epoxidoberfläche signifikant ab. Diese Abnahme der π^* Resonanz bestätigt die geringere Zahl von verfügbaren Epoxidgruppen für die Reaktion mit TFMBA nach der vorhergehenden Immobilisierung von Amino-Cyclodextrin.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#] [Atom-%]						WCA
	C	N	O	F	Fe 2p	Si	
Epoxid (1)	35.7	–	38.7	–	–	25.6	54
β -Amino-Cyclodextrin (5)	23.6	1.0	42.3	–	–	33.1	31
TFMBA (3)	28.8	0.7	37.3	3.6	–	29.6	64
CD-TFMBA (6)	26.5	2.2	37.1	1.4	–	32.9	57
CD-Ferrocen (7)	76.3	0.2	11.9	–	0.4	11.3	78

[#] Al K α (1486.6 eV)

Tabelle 5b: Mit XPS ermittelte Element-Oberflächenkonzentrationen bestimmt in den Experimenten an der Siliziumwaferoberfläche, die an der β -Amino-Cyclodextrin an Epoxidgruppen immobilisiert wurde (Epoxidoberfläche 1 als Referenz).

Mit einem Kontaktwinkel von $\theta = 51^\circ \pm 1^\circ$ erweist sich die sukzessive CD-NH₂ und TFMBA modifizierte Oberfläche **6** im Vergleich zur ausschließlich CD-NH₂ immobilisierten Oberfläche **5** ($\theta = 31^\circ \pm 1^\circ$) als deutlich hydrophober. Dieser Unterschied ist Folge (und unabhängiger Beweis) der substanziellen Anzahl von noch reaktiven Epoxidgruppen, die mit TFMBA reagiert haben und nun mit hydrophoben CF₃-Gruppen ausgestattet sind.

Im Vergleich zu der aus experimentell ermittelten Stickstoffoberflächenkonzentration berechneten Immobilisierungsausbeute von β -Amino-Cyclodextrin von ~83%, ist die mit Hilfe der Reaktion der verbliebenen reaktiven Epoxidgruppen der Cyclodextrinoberfläche mit TFMBA anhand der C-F-Komponente der CF₃-Gruppe im C1s Spektrum berechnete Ausbeute mit 34% deutlich niedriger.

Zusätzlich wurde die Immobilisierungseffizienz für β -Amino-Cyclodextrin anhand der Differenzbildung der Stickstoff- und Fluoroberflächenkonzentration im XPS Übersichtsspektrum bestimmt (Tabelle 6). Anhand der experimentell ermittelten Fluoroberflächenkonzentration wurde eine 18%ige Immobilisierungsausbeute der Cyclodextrin Moleküle auf Epoxidoberflächen ermittelt. Bedingt durch auftretende Kohlenstoff-Kontaminationen sind jedoch in diesem Fall die Messunsicherheiten sehr groß und können so zu einer Verfälschung der berechneten Ausbeute führen. Zusätzlich zeigte die experimentell ermittelte Stickstoffoberflächenkonzentration einen deutlich überhöhten Wert (2.2 At-%) im Vergleich zur TFMBA derivatisierten Oberfläche **3** (0.7 At-%). Dies lässt vermuten, dass der hohe Stickstoffanteil der Cyclodextrin-TFMBA-Oberfläche **6** im XPS-Übersichtsspektrum aus adsorbierten Cyclodextrin- und TFMBA Molekülen auf der Oberfläche resultiert.

	Ausbeute nach TFMBA Derivatisierung auf Epoxid-Oberflächen	Ausbeute nach TFMBA Derivatisierung auf CD-NH ₂ -Oberflächen	Ausbeute CD-NH ₂ aus Differenzbildung
Aus Übersicht [F] (GL2)	~29 %	~11 %	~18 %
Aus Übersicht [N] (GL3)	~17 %	~29 %	-
Aus CF ₃ aus hochaufgel. C1s	~55 %	~21 %	~34 %

Tabelle 6: Verfahren zur Abschätzung der Ausbeute immobilisierter Cyclodextrin Moleküle auf Epoxidoberflächen ausgehend vom Fluor- und Stickstoffwert im XPS-Übersichtsspektrum und anhand der CF₃-Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum nach TFMBA Immobilisierung auf Cyclodextrin Oberflächen.

Weiterhin spiegeln sich die Größe und die damit verbundene räumliche Ausdehnung der Amino-Cyclodextrin Moleküle in den Reaktionsausbeuten der CD-TFMBA-Oberfläche wider. Dies lässt vermuten, dass die sterisch anspruchsvollen Cyclodextrin-Moleküle die Zugänglichkeit zu den noch verbliebenen reaktiven Epoxidgruppen erschweren. Es kann zu einer sterisch bedingten schlechteren Derivatisierung der Epoxidgruppen kommen. Der erhöhte Stickstoffanteil im XPS Übersichtsspektrum erklärt sich damit, dass im Fall einer Lagerung der Proben zusätzlicher Sauerstoff und Stickstoff in die Oberfläche eingebaut wird.

4.4.2.2 Gast-Wirt-Wechselwirkung zwischen immobilisierten β -Amino-Cyclodextrin und Ferrocen

Ein in der Biosensorik häufig verfolgter Ansatz sind Reaktionen, die über eine Gast-Wirt-Komplexbildung laufen. Nach der Immobilisierung und Charakterisierung der Cyclodextrinoberfläche wird ein einfaches, biosensorisch interessantes Gast-Wirt Modell untersucht. Häufig werden Rezeptormoleküle auf einem festen Substrat immobilisiert, da sie dort kontrolliert verschiedenen Analyten ausgesetzt werden können. In herkömmlichen Nachweisverfahren werden die nachzuweisenden Gastmoleküle im Gast-Wirt Komplex radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. An einer Oberfläche lassen sich Gast-Wirt-Komplexe mit oberflächenanalytischen Methoden nachweisen.

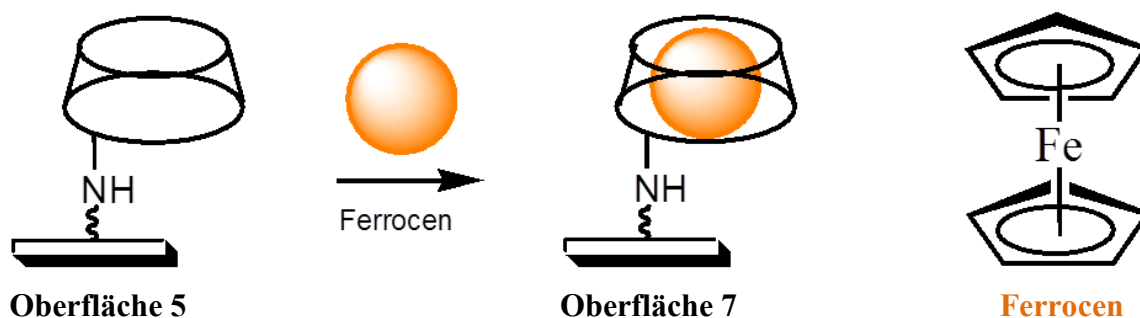


Abbildung 31: Reaktionsschema der Komplexbildung von β -Amino-Cyclodextrin mit Ferrocen.

In dieser Arbeit wurde ein Metallkomplex, Ferrocen als Gastmolekül, ausgewählt, das durch Einlagerung in β -Amino-Cyclodextrin eine Einschlussverbindung bilden kann (Abbildung 31, Oberfläche 7). Das Eisen im Ferrocenmolekül dient hier als Marker für die qualitative Oberflächenanalyse mit XPS.

Abbildung 32 zeigt die hochaufgelösten Detailspektren für Eisen Fe2p und Kohlenstoff C1s. Als Indikator für die Interaktion der Ferrocenmoleküle (Gast) mit den auf der Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche immobilisierten Cyclodextrinmolekülen (Wirt) dient die Fe 2p-Photo-Elektronenemission. Das Fe 2p Spektrum wird formal mit vier Komponenten angepasst (Abbildung 32b). Für die Fe 2p_{3/2}- und Fe 2p_{1/2}-Signale wurden die Bindungsenergien bei ~709.7 eV und ~722.5 eV nachgewiesen. Die gleichzeitige Anregung mehrerer Elektronen des Eisenatoms führt zum Auftreten von Shake-up-Satellitenlinien, diese wurden als sogenannte Shake-up-Signale im Fe 2p Spektrum sichtbar. Die Shake-up-Satelliten des Ferrocen Moleküls liegen bei 714.8 eV und 727.1 eV. Dieser Befund spricht für die Präsenz koordinativ gebundener Ferrocenmoleküle in den Cyclodextrinmolekülen. Weiterhin ergibt die mit Ferrocen behandelte Cyclodextrinoberfläche eine hohe Intensität der C-C-Komponente (75.0 Fläche-%) im XPS Kohlenstoffspektrum (Abbildung 32a), welche die C-C Funktionalitäten der Cyclopentadieneinheiten des Ferrocenmoleküls repräsentiert.

Das XPS Übersichtsspektrum in Abbildung 33 verzeichnet eine signifikante Zunahme der Oberflächenkonzentration des Kohlenstoffs (76.3 At-%) im Vergleich zur CD-Oberfläche mit einem Kohlenstoffanteil von 23.6 At-%. Zudem zeigt das Spektrum ein Fe 2p Signal bei 711 eV (0.4 At-%) (Abbildung 33, Tabelle 6). Unter der Annahme, dass ein Ferrocenmolekül mit einem Cyclodextrin-Molekül reagiert, folgt dass ~40% der Cyclodextrinoberfläche mit Ferrocenmolekülen besetzt ist.

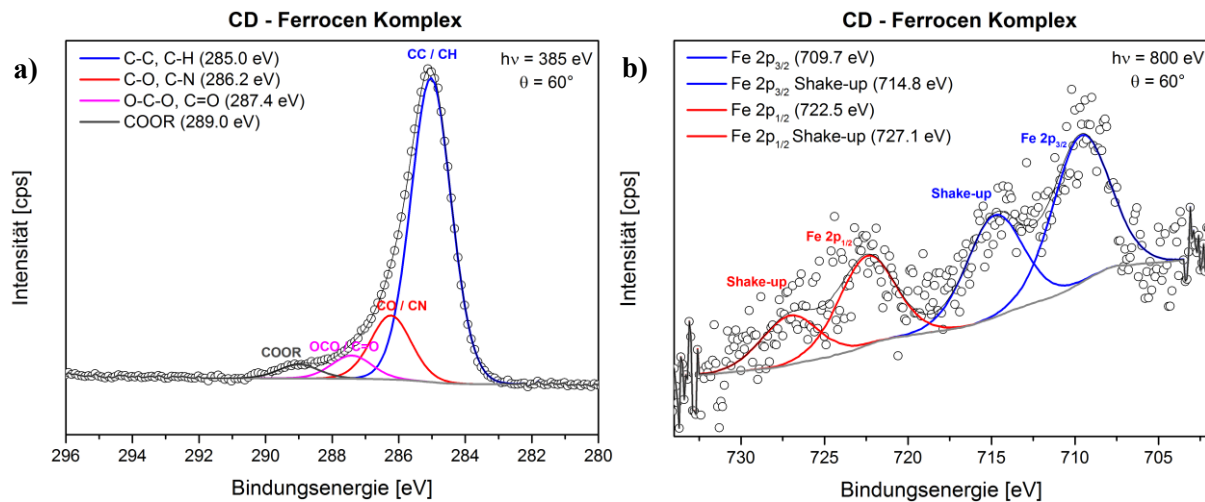


Abbildung 32: Hochauflöstes XPS C1s Spektrum (a) und Fe2p Spektrum (b) eines CD-Ferrocen Komplexes auf Epoxid-funktionalisierter Siliziumwaferoberfläche ($h\nu = 385 \text{ eV}$ und 800 eV , HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm).

Der Kontaktwinkel steigt nach der Interaktion der Ferrocenmoleküle mit den Cyclodextrin-Oberflächen von $\sim 31^\circ \pm 1^\circ$ (CD-Oberfläche) auf $\sim 78^\circ \pm 1^\circ$. Im Vergleich zu den Cyclodextrin-Oberflächen steigt der Kontaktwinkel durch die deutlich hydrophobere Oberfläche bedingt durch die Cyclopentadieneinheiten des Ferrocenmoleküls deutlich an.

Um sicherzustellen, dass das Fe2p Signal nicht durch unspezifische Bindungen der Ferrocenmoleküle mit nach der Cyclodextrin-Immobilisierung noch verfügbaren Epoxiden auf der Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche hervorgerufen wird, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierfür wurde die Epoxidoberfläche ohne Cyclodextrin-Immobilisierung mit Ferrocenmolekülen in Kontakt gebracht. Sowohl im hochauflösten Energiefenster des zu erwartenden Fe2p Spektrums als auch im XPS-Übersichtsspektrum ist kein Signal (Anhang 2), welches auf Fe hindeutet, zu beobachten. Aus diesem Kontrollexperiment lässt sich schlussfolgern, dass das an der Oberfläche 7 beobachtete Fe2p Signal ein direkter Nachweis von Bindungsereignissen zwischen den Ferrocenmolekülen und der Cyclodextrin Oberfläche ist.

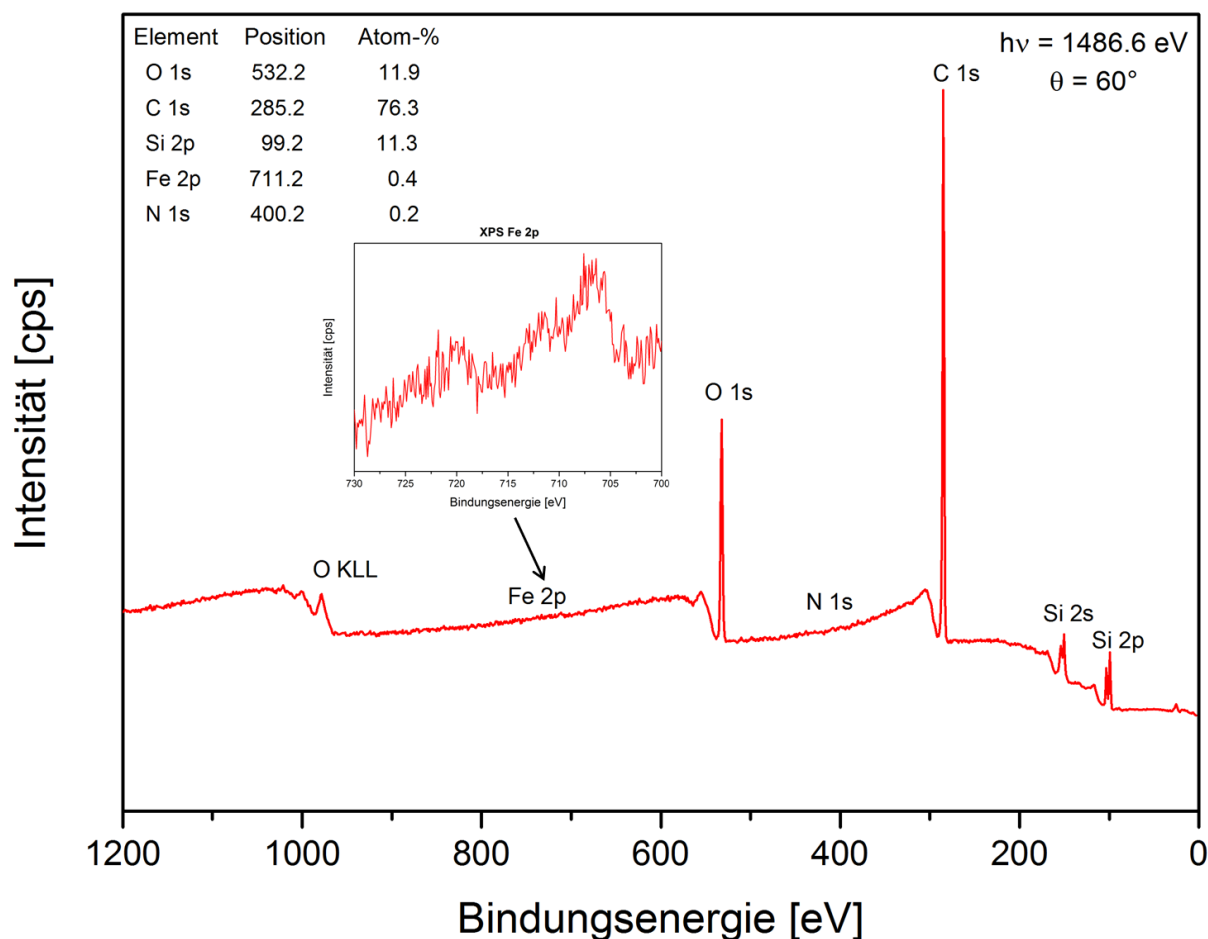


Abbildung 33: XPS Übersichtsspektrum eines Cyclodextrin-Ferrocen Gast-Wirt-Komplexes auf einer Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).

Es ist anzunehmen, dass für eine effektive Komplexbildungsreaktionen an immobilisiertem β -Amino-Cyclodextrin die Cyclodextrin-Moleküle in einer richtigen Vorzugsorientierung vorliegen. Wenn die Cyclodextrine mit nur einer Ankergruppe an die Oberfläche binden, werden sie häufig eine Konformation einnehmen, die nicht optimal für die Bindung des Gastmoleküls sind^[236-237]. Für den Aufbau eines Modell-Biosensors sollte deshalb der Ansatz verfolgt werden, das Cyclodextrin mit mehreren Amino-Ankergruppen an die Oberfläche zu binden. In der Literatur werden solche Ansätze, die auf dem Austausch von Hydroxylen am Cyclodextrin durch Aminogruppen basieren, diskutiert^[238].

Als Ankergruppe sollten weitere Aminogruppen verwendet werden, indem die sieben C₆-Hydroxylgruppen an der schmalen Öffnung des β -Cyclodextrins durch Jod substituiert werden. In einem weiteren Schritt wird dann das Jod durch eine primäre Aminogruppe ersetzt. Das Produkt per-Amino- β -Cyclodextrin sollte nach der Reaktion an der schmalen Seite des Torus pro Monomer jeweils eine Aminogruppe aufweisen. Durch die Lage der Aminogruppen sollte es möglich sein, die Cyclodextrine in der gewünschten Konformation auf eine spezifisch amin-bindenden Oberfläche aufzubringen.

Diese Cyclodextrin-Oberflächen können als Modell für weitere Biosensoren Anwendung finden. Die Immobilisation von Ferrocen kann als erster Schritt zur Verwendung der

Cyclodextrinoberflächen als Biosensor angesehen werden. Diese Wirt-Gast-Komplexe können genutzt werden, um Analyt-Bindungen als Modell für Biosensoren nachzuahmen.

4.4.3 Immobilisierung von Modell-Glykanen mit Fluorlabel

Im vorhergehenden Kapitel wurde eine indirekte quantitative Bestimmung des Polysaccharids β -Amino-Cyclodextrin auf Epoxid-Template besprochen. Wenn man über Modell-Glykane verfügt, die z.B. ein Fluorlabel tragen, kann ein direktes XPS Verfahren zur quantitativen Bestimmung von gebundenen Glykan Sondenmolekülen eingesetzt werden. Das Element Fluor eignet sich hierfür besonders, da das F1s Signal in XPS mit einer hohen Empfindlichkeit gemessen werden kann. Durch die Einführung von CF_3 -Gruppen als Bestandteil des Markers erhält man einerseits pro Glykan Molekül drei F Markeratome und andererseits im hochaufgelösten C1s ein stark zu größeren Bindungsenergien verschobenen und somit eindeutig zuordenbaren Komponentenpeak der für eine Quantifizierung genutzt werden kann (s.a. Abbildung 35).

Dies war die Motivation Glykane mit einem Fluorlabel zu synthetisieren und die Effizienz der entsprechenden Immobilisierungsreaktionen zu untersuchen. Im Hinblick auf die Microarray-Experimente, die später in Kapitel 4.6 besprochen werden, ist dieses Experiment am Modell eine wichtige Methodenentwicklung.

Die Fluormarkierung erfolgt am reduzierenden Ende der Maltotriose (Abbildung 34). Als Fluorlabel wurde 2-Aminotrifluormethylpyridin (ATFMP) oder 4-trifluormethylbenzylamin (TFMBA) verwendet.

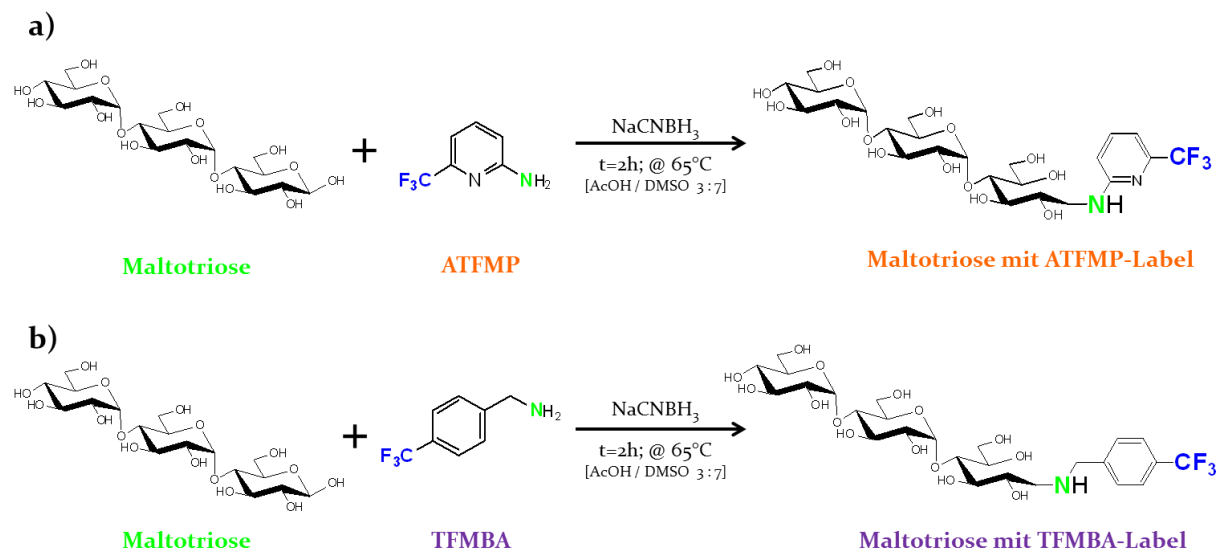


Abbildung 34: Reaktionsschemen der reduktiven Aminierung von Maltotriose mit ATFMP (a) bzw. TFMBA (b).

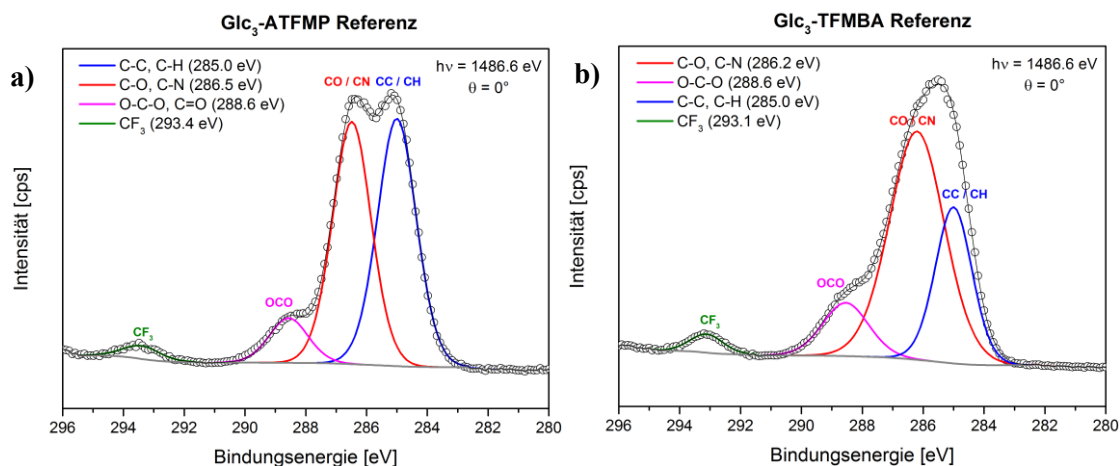


Abbildung 35: XPS C1s Spektren von Maltotriose mit ATFMP-Label (a) und Maltotriose mit TFMBA-Label (b), jeweils als Referenz durch spin coating auf Siliziumwafer als Schicht deponiert ($h\nu = 385 \text{ eV}$, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von 1.1 nm).

Nach der Synthese der fluorierten Glykane wurden sowohl MALDI-TOF-MS-Messungen als auch XPS Messungen durchgeführt. Die MALDI-TOF-MS Daten bestätigen die erfolgreiche Synthese der fluorierten Glykane (s.a. Anhang 3). In den hochaufgelösten XP Kohlenstoffspektren der durch spin-coating hergestellten ATFMP bzw. TFMBA Schichten (Abbildung 35) erscheinen jeweils Komponenten bei 293 eV, welche die CF₃-Gruppen repräsentieren und dem eingebauten Fluorlabel zugeordnet werden. Acetal-Komponenten, die die Präsenz von Saccharidgruppen (O-C-O) zeigen, erscheinen bei 288 eV. Die Komponente bei ~286 eV wird den Alkoxygruppen und den C-N Bindungen der Glykane zugeordnet. Komponenten bei 285 eV werden den aromatischen Funktionalitäten, d.h. dem aromatischen Ring bzw. des Pyridins der Marker ATFMP bzw. TFMBA gehören, zugeordnet. Für beide Referenzschichten werden Oberflächenkonzentrationen von ~1.7 At-% bis ~8.0 At-% für Stickstoff und von ~3.7 At-% bis ~7.0 At-% für Fluor gefunden (XPS-Übersichtsspektren siehe Anhang 4 und 5).

Die Immobilisierungsreaktion der fluorierten Glykane Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen ist in Abbildung 36 dargestellt. Es wurden hochaufgelöste XPS Detailspektren von C1s, N1s und F1s Orbitalen aufgenommen und quantifiziert. Nach der Immobilisierung der fluorierten Glykane beobachtet man erwartungsgemäß im XPS C1s-Spektrum (Abbildung 37) den Komponentenpeak bei der Bindungsenergie von ~293 eV, der die CF₃-Gruppen der fluorierten Glykane repräsentiert und der eine Schätzung der Immobilisierungseffizienz der Glykane auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen zulässt.

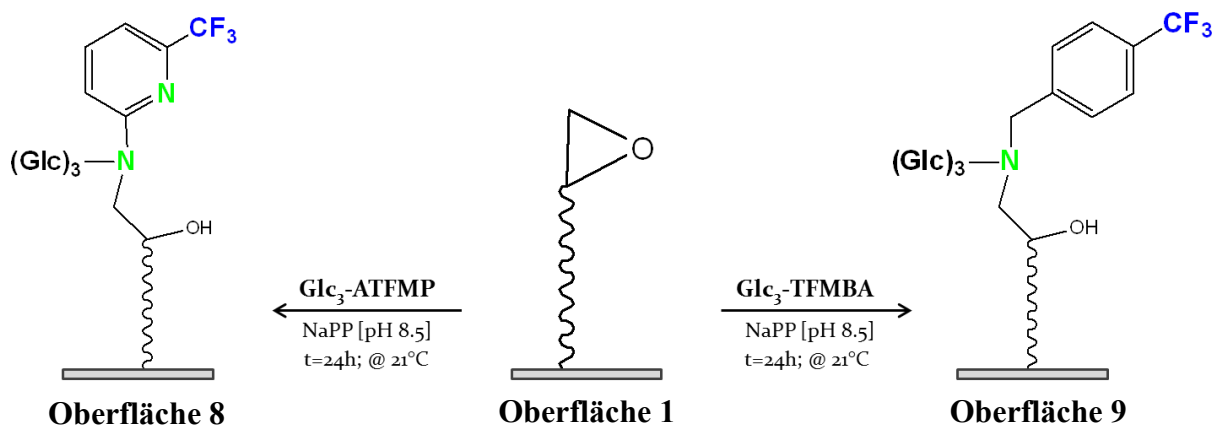


Abbildung 36: Reaktionsschemen der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von fluorierten Glykanen mit Aminolinker (Glc₃-ATFMP bzw. Glc₃-TFMBA) auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen.

Zunächst wird die Immobilisierung der Maltotriose mit 2-Aminotrifluormethylpyridin (ATFMP) Label auf der Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche (Abbildung 36, Oberfläche 8) untersucht. Das XPS-Übersichtsspektrum zeigt eine Stickstoff-Oberflächenkonzentration von ~0.9 At-% und eine Fluor-Oberflächenkonzentration von ~2.3 At-% (Abbildung 38, Tabelle 7). Anhand des für die auf Epoxidoberflächen immobilisierten Glc₃-ATFMP-Moleküle stöchiometrisch berechneten Wertes von 3.5 At-% für Stickstoff ergibt sich mit der experimentell ermittelten Oberflächenkonzentration von 0.9 At-% eine Reaktionsausbeute von ~26%.

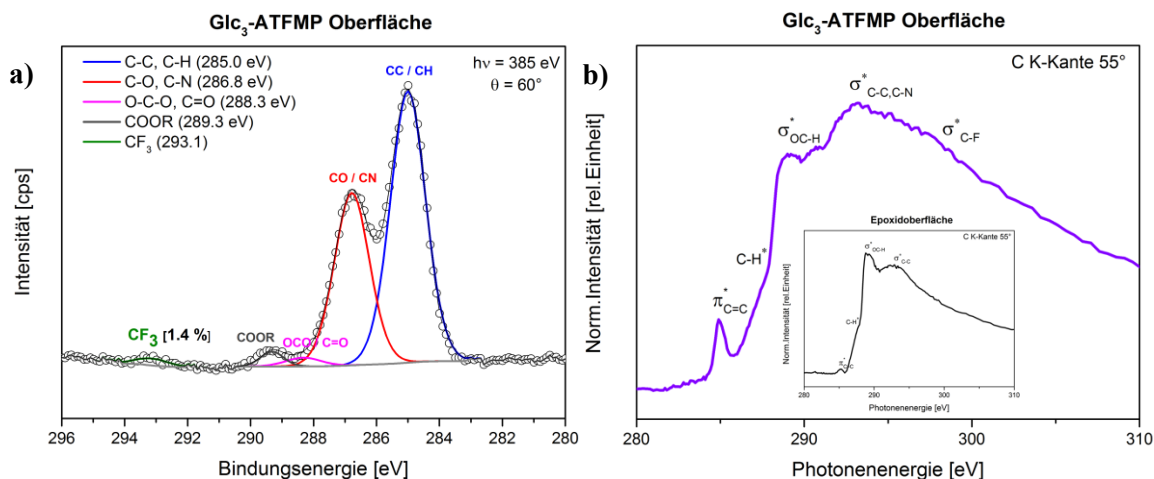


Abbildung 37: XPS C1s Spektrum (a) (hν = 385 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) und C K-NEXAFS-Spektrum (Epoxidoberfläche im Bild zum Vergleich) (b) einer Glc₃-ATFMP Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.

Im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum (Abbildung 37a) erscheint die CF_3 Komponente bei 293.1 eV mit 1.4 Flächen-%. Weiterhin finden sich die bereits bekannten C1s Komponenten der Glykane wieder (Tabelle 7). Die COOR Komponente bei 289.3 eV wird Verunreinigungen zugeordnet. Der aus der CF_3 -Komponente berechnete Umsatz liegt bei $\sim 42\%$.

Neben hochaufgelösten C1s-Spektren, wurden auch hochaufgelöste N1s-Spektren aufgenommen (Abbildung 38). Dabei werden zwei Komponenten beobachtet. Die bei 400.4 eV (59.5 Flächen-%) beobachtete Komponente wird dem R_3N Signal des Glykans und die bei 402.6 eV (40.5 Flächen-%) den protonierten Funktionalitäten zugeordnet.

Kontaktwinkelmessungen deuten auf die erfolgreiche Immobilisierung des Glykanes $\text{Glc}_3\text{-ATFMP}$ auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen hin. Der gemessene Kontaktwinkel beträgt $43^\circ \pm 1^\circ$.

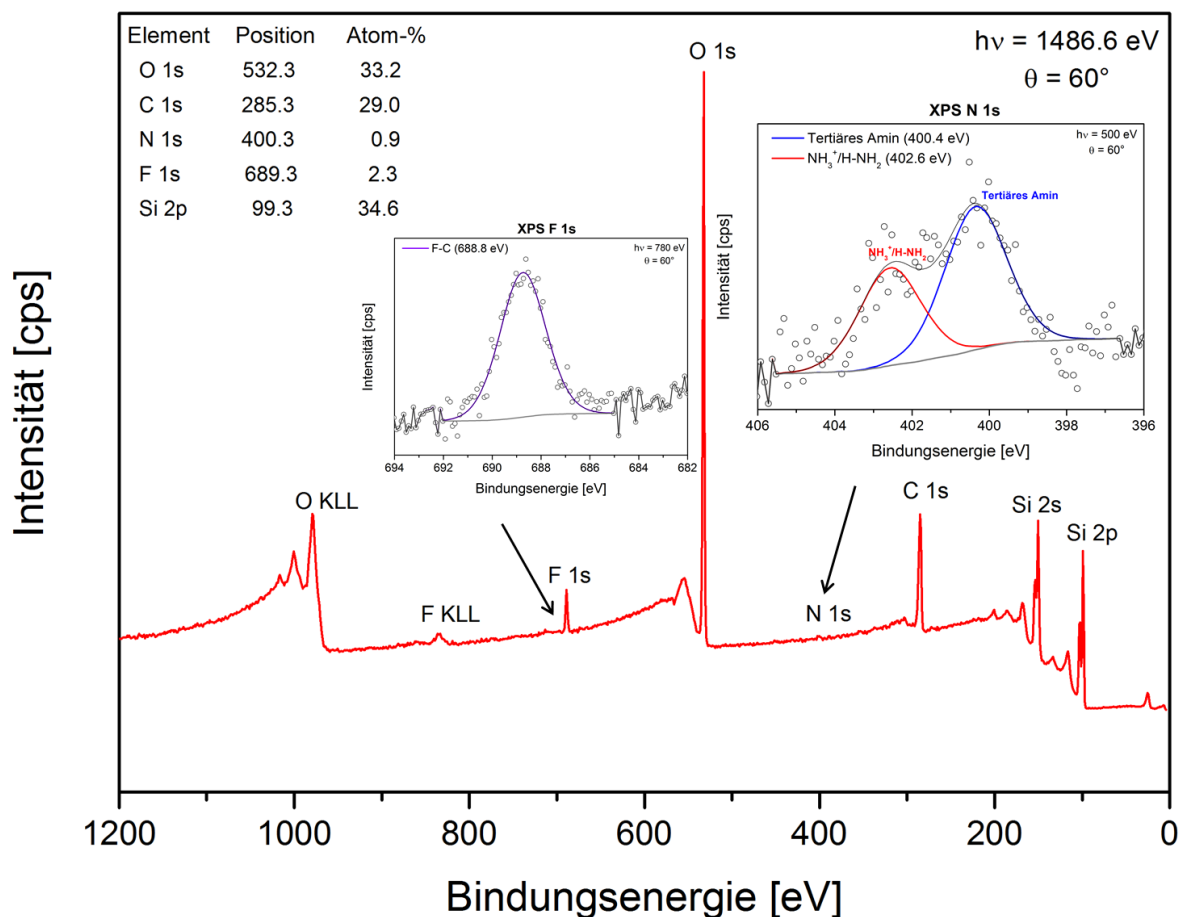


Abbildung 38: XPS Übersichtsspektrum ($\text{Al K}\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780 \text{ eV}$ und 500 eV , HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) einer $\text{Glc}_3\text{-ATFMP}$ - Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.

NEXAFS-Spektren wurden mit dem Ziel aufgenommen, weitere unabhängige Nachweise für die Immobilisierung von Glc₃-ATFMP zu liefern. Die Abbildung 37b zeigt das Spektrum der Kohlenstoff-K-Kante. Die leicht asymmetrisch verbreiterte π^* -Resonanz bei ~285 eV repräsentiert die C=C- und C=N Bindungen im Pyridin-Ring des ATFMP-Labels. Zusätzlich zeigt die Glykanoberfläche σ^* -CF-Resonanzen des Markers im Bereich um 296.3 und 297.9 eV. Die breite σ^* -Resonanz bei 289.0 eV lässt sich den OC-H-Funktionalitäten der Glykane zuordnen. Es finden sich also auch im NEXAFS K-Kanten Spektrum klare Hinweise auf die Immobilisierung von Glc₃-ATFMP. Zusätzlich verweist die CH*-Resonanz zwischen 287.5 und 287.8 eV auf die aliphatische Kette des Epoxid-Linkers.

Die Immobilisierung der Maltotriose mit 4-trifluormethylbenzylamin (TFMBA) Label auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat wird nun untersucht (Abbildung 36, Oberfläche 9).

Das quantifizierte XPS Übersichtsspektrum (Abbildung 40) liefert Oberflächenkonzentrationen für Stickstoff von ~ 1.1 At-% und Fluor von ~ 2.5 At-%. Anhand des stöchiometrisch berechneten Werts des Stickstoffs für die Schicht der auf der Epoxidoberfläche immobilisierten Glc₃-TFMBA-Moleküle von 1.7 At-%, ergibt sich, ausgehend vom experimentell ermittelten Stickstoffwert von 1.1 At-%, eine Reaktionsausbeute von ~65%.

Die C1s Komponenten im hochaufgelösten Kohlenstoffspektrum (Abbildung 39a) werden wie folgt Kohlenstoffspezies zugeordnet (Tabelle 7): TFMBA Ringatome und aliphatische Epoxylinker bei 285.0 eV, Alkoxygruppen und C-N Bindungen des Glykans bei 286.5 eV, Glykan-spezifische Acetalgruppen bei 288.1 eV, COOR Funktionalitäten als Verunreinigung bei 289.2 eV und CF₃-Gruppen bei 292.9 eV. Anhand der relativen Fläche der CF₃-Gruppe von 2.5 Flächen-% wird die Immobilisierungseffizienz zu ~ 80% geschätzt.

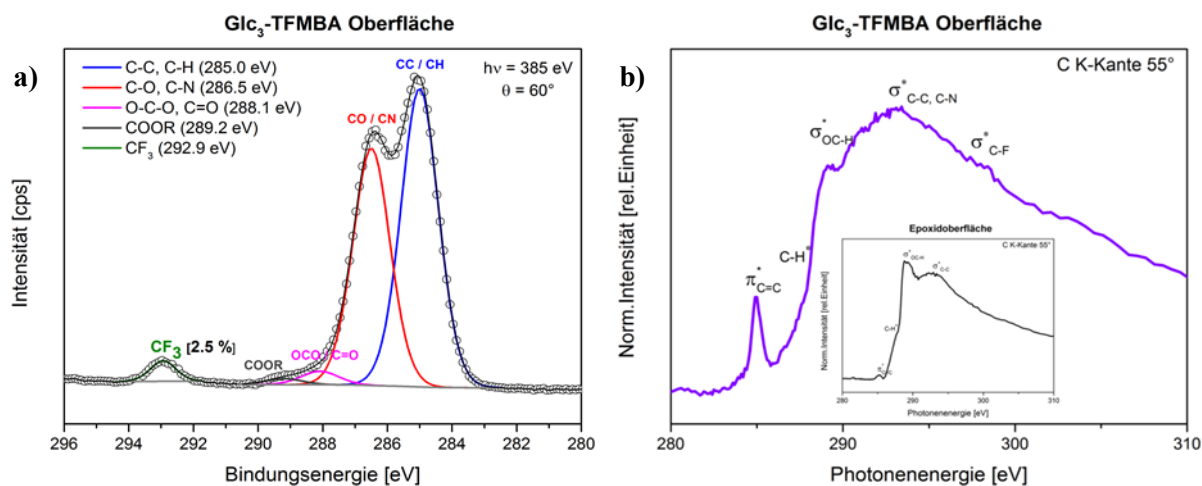


Abbildung 39: XPS C1s Spektrum (a) ($h\nu = 385 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) und C K-NEXAFS-Spektrum (b) (Epoxidoberfläche im Bild) einer Glc₃-TFMBA Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.

Das N1s-Spektrum (Abbildung 40) enthält wieder zwei Komponenten. Die eine Komponente bei 399.7 eV (64.7 Flächen-%) repräsentiert das Stickstoffzentrum des Glc₃-TFMBA Glykan Moleküls, die andere bei 402.1 eV (35.3 Flächen-%) repräsentiert die NH₃⁺/H-NH₂ Komponente. Der gemessene Kontaktwinkel beträgt für Glc₃-TFMBA-Oberflächen 46° ± 1°.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#]					C1s Komponenten der Peakfläche [*]				
	[Atom-%]					[Flächen-%]				
	C	N	O	Si 2p	F	CC/CH	CO/CN	O-C-O/C=O	C _{cont.}	CF ₃
Epoxid (1)	35.7	—	38.7	25.6	—	48.5	46.1	3.0	2.4	—
Glc ₃ -ATFMP (8)	29.0	0.9	33.2	34.6	2.3	57.9	36.8	1.9	2.1	1.4
Glc ₃ -TFMBA (9)	30.7	1.1	38.0	27.8	2.5	52.4	41.7	2.4	1.1	2.5

^{*} Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al Kα (1486.6 eV)

Tabelle 7a: Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und C1s Komponenten der Peakfläche von Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen nach der Immobilisierung von Maltotriose mit ATFMP bzw. TFMBA-Label.

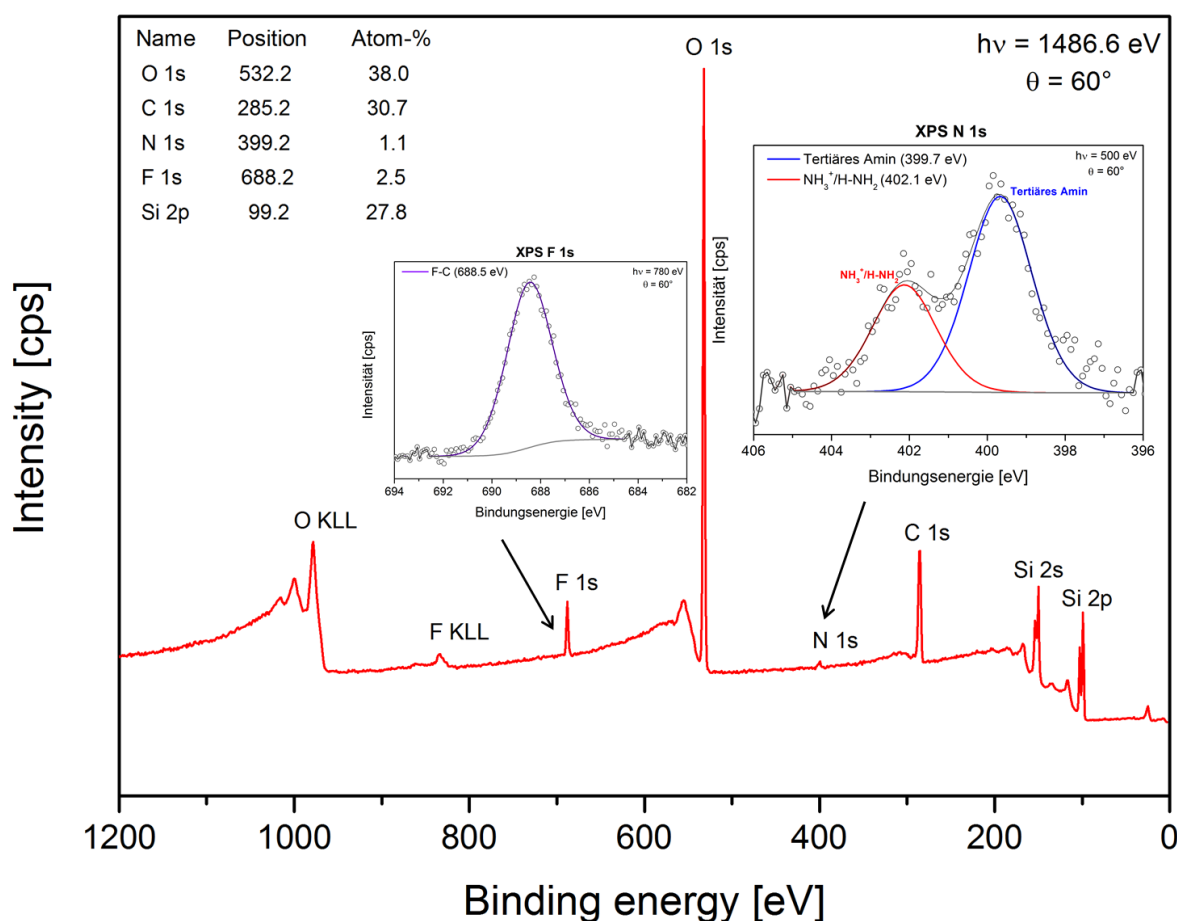


Abbildung 40: XPS Übersichtsspektrum (Al Kα, hν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren (hν = 780 eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer Glc₃-TFMBA-immobilisierten Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.

Der direkte Vergleich der Stickstoffkomponenten in den XPS Übersichtsspektren mit den CF_3 -Komponenten in den hochaufgelösten Kohlenstoffspektren zeigen sowohl für die Glc_3 -ATFMP-Moleküle als auch für die Glc_3 -TFMBA-Moleküle deutliche Unterschiede in den Reaktionsumsätzen. Die relativ niedrigen Stickstoffanteile in den XPS-Übersichtsspektren resultieren vermutlich aus dem Vorhandensein eines überschätzten Kohlenstoffanteils. Dieser deutlich erhöhte Kohlenstoffanteil kann durch Kontaminationen aus der Laboratmosphäre resultieren.

Der niedrigere Umsatz der ATFMP markierten Glykane lässt sich mit dem induktiven Effekt erklären. Die CF_3 -Gruppe führt zu einer Erniedrigung der Elektronendichte am substituierten C-Atom. Dieser Effekt wirkt aus reaktionskinetischer Sicht deaktivierend auf die Amino-Gruppe. Im Falle der TFMBA markierten Glykane blockiert die CH_2 -Komponente am Stickstoffatom jedoch die elektronenziehende Wirkung der CF_3 -Komponente. Dieser elektronenschiebende Substituent (CH_2 -Komponente) stabilisiert die Position am Stickstoff und führt somit zu einer höheren Reaktivität der Aminogruppe.

Weiterhin wurden NEXAFS-Spektren aufgenommen. Das C K-NEXAFS-Spektrum (Abbildung 39b) zeigt eindeutig π^* -Resonanzen, die den Aromaten in TFMBA zugeordnet werden (Abbildung 39b). Neben der π^* -Resonanz werden weitere charakteristische Resonanzen gemessen: Die charakteristische σ^* -Resonanz der OC-H-Funktionen der Glykane bei 289.0 eV, eine für aliphatische Kohlenwasserstoffe typische CH^* -Resonanz bei 287.5 eV vom Epoxysilan Linker und die σ^* -CF-Resonanz zwischen 296.3 und 297.9 eV.

4.4.4 Zusammenfassung

Es wurden Zucker-Oberflächen, die als Modelle für Glykan-Microarrays dienen, mit oberflächenanalytischen Methoden charakterisiert. Alle untersuchten Sondenmoleküle (Glucosamin, β -Amino-Cyclodextrin, Maltotriose mit Fluorlabel) sind kovalent auf den verwendeten Epoxidoberflächen immobilisierbar. Glucosamin und β -Amino-Cyclodextrin wurde dabei anhand der Stickstoff-Marker qualitativ mittels XPS nachgewiesen. Die Zucker mit Fluorlabel wurden zusätzlich mit XPS anhand der Fluor-Markergruppe (CF_3) und mittels NEXAFS Spektroskopie mit der Aromat-Markergruppe nachgewiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Wirt-Gast-Komplexe aus immobilisiertem Cyclodextrin (CD-NH_2) mit Ferrocen als Gast als Modell für Biosensoren betrachtet werden können.

Es wurden verschiedene Quantifizierungsansätze mit dem Ziel der Abschätzung der Effizienz der Immobilisierungsreaktion mittels XPS benutzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7b zusammengefasst. Die Quantifizierung basiert grundsätzlich auf der Auswertung der XPS Übersichtsspektren, d.h. auf relativen Intensitäten für die N1s, C1s bzw. F1s Orbitale. Alternativ kann das hochaufgelöste C1s Spektrum benutzt werden in dem der Flächenanteil der CF_3 Komponente ausgewertet wird.

	Quantifizierungsverfahren mit Immobilisierungsausbeuten		
Oberfläche	XPS Übersichtsspektrum: N1s Marker	XPS Übersichtsspektrum: F1s Marker	Hochaufgelöste C1s XPS: CF₃ Komponente
Glc-NH₂ (4)	~29 %	-	-
β-CD-NH₂ (5)	~83 %	-	-
Glc₃-ATFMP (8)	~26 %	~43 %	~42 %
Glc₃-TFMBA (9)	~65 %	~48 %	~80 %

Tabelle 7b: Verfahren zur Abschätzung der Ausbeute immobilisierter Glykan Moleküle (Glucosamin, β -Amino-Cyclodextrin, Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA) auf Epoxidoberflächen ausgehend vom Stickstoff- bzw. Fluorwert im XPS-Übersichtsspektrum bzw. anhand der CF₃-Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum.

Es wurde gezeigt, dass sich sowohl die Glucosamin Moleküle (Glc-NH₂), die Cyclodextrin Moleküle (CD-NH₂) als auch die synthetisierten Glykane mit Fluorlabel (Glc₃-ATFMP, Glc₃-TFMBA) an die Epoxidgruppen fixieren und quantifizieren lassen. Anhand des Stickstoff Markers weisen die Cyclodextrin Moleküle jedoch deutlich höhere Reaktionsausbeuten auf im Vergleich zu den Glucosamin Molekülen und den Fluor-markierten Molekülen. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen Cyclodextrin Moleküle ist die Erreichbarkeit aller reaktiven Epoxidgruppen jedoch nicht gewährleistet, das bestätigt auch das indirekte Quantifizierungsverfahren deutlich, in dem noch reaktive Epoxidgruppen auf der Cyclodextrin Oberfläche mit TFMBA reagieren. Das erhöhte Stickstoff-Signal der Cyclodextrin-Oberfläche resultiert wahrscheinlich aus dem Vorhandensein eines überschätzten Stickstoffanteils, der als Kontamination mit Stickstoffhaltigen Molekülen begründet ist. Die Glucosamin Moleküle hingegen zeigen tendenziell niedrigere Reaktionsausbeuten als die Glykane mit Fluorlabel. Der niedrige Reaktionsumsatz der Glucosamin Moleküle lässt sich mit der niedrigen Reaktivität des Glucosamin Salzes erklären, da vermutlich die erforderliche Freisetzung der Amine aus dem Salz nur teilweise erfolgt.

Beim direkten Vergleich der Glykane mit verschiedenen Fluorlabeln, lässt sich feststellen, dass die Glc₃-TFMBA Moleküle eine deutlich höhere Immobilisierungseffizienz aufweisen als die Glc₃-ATFMP Moleküle. Im Vergleich der mit XPS bestimmten Immobilisierungseffizienzen erhält man für die Glc₃-ATFMP Moleküle geringere Ausbeuten als für die Glc₃-TFMBA Moleküle. Dies bestätigt auch das NEXAFS Experiment in dem die Intensität der π^* -Resonanz im C K-Kantenspektrum der Glc₃-TFMBA-Oberflächen im Vergleich zu den Glc₃-ATFMP-Oberflächen deutlich höher ist.

Im Vergleich zur Glc₃-ATFMP-Oberfläche ist der Kontaktwinkel der Glc₃-TFMBA-Oberfläche nur minimal höher. Der mit beiden Oberflächen gemessene Winkel ist jedoch wesentlich höher als die Kontaktwinkel, die für Cyclodextrin-Oberflächen gemessen wurden (vgl. Kapitel 4.4.2). Offensichtlich wird der mit den OH-Gruppen verbundene hydrophile Charakter für die Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA Oberflächen durch den hydrophoben Charakter der CF₃ Gruppen tendenziell unterdrückt.

4.5 Die Beobachtung von Glykan-Lektin-Interaktionen mit oberflächenanalytischen Methoden

Für eine effektive Anwendung von Zucker-basierten Microarrays ist die Zugänglichkeit von Glykan Sondenmolekülen für die Interaktionen mit Protein-Targets ein wichtiger Punkt. Eine erfolgreiche Interaktion beweist, dass Glykan Sondenmoleküle i) auf der Oberfläche immobilisiert wurden und ii) die Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität sowie die Zugänglichkeit der Zielmoleküle gewährleistet ist.

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen des Modell-Lektins Concanavalin A mit Glykan-Oberflächen (Kapitel 4.4.3) untersucht. Die Charakterisierung der Glykan-Con A-Oberflächen erfolgte mittels XPS und NEXAFS. Con A hat die Fähigkeit spezifisch bestimmte Kohlenhydrate zu binden, insbesondere α -D-Glucose. Daher findet Con A eine breite Anwendung in der Biochemie. Bei neutralem pH-Wert (7.4) und in Anwesenheit von Mangan- und Calciumionen nimmt Concanavalin A eine Tetramerstruktur an und kann in dieser Form z.B. Oligoglucose Moleküle binden. Aufgrund der hohen Oberflächenaffinität von Concanavalin A für Epoxidgruppen kommt es aber zu unspezifischen Interaktionen mit diesen Gruppen. Durch die Deaktivierung aller verbliebenen aktiven Epoxidgruppen mit Ethanolamin (EA) wird sichergestellt, dass nur spezifische Interaktionen des Concanavalin A mit den Glykan Sondenmolekülen auf den Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen beobachtet werden.

4.5.1 Charakterisierung von Concanavalin A mittels XPS und NEXAFS

Zunächst wurde eine Concanavalin A Referenzprobe hergestellt. Dazu wurde Concanavalin A in Tris-Puffer (pH 7.4, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2) gelöst und auf eine Siliziumoberfläche getropft. Nach Verdampfen des Wassers, erhielt man eine Schicht an Concanavalin A auf der Siliziumoberfläche. Anschließend wurden die XPS- und NEXAFS-Spektren aufgenommen.

Die C-C-Komponente bei einer Bindungsenergie von 285.0 eV im C1s-Spektrum (Abbildung 41a) lässt sich dem Proteinrückgrat zuordnen. Sauerstoffgebundener –und stickstoffgebundener Kohlenstoff (C-O und C-N) ist mit einer Bindungsenergie von 286.6 eV ebenfalls im Spektrum zu finden. Der Kohlenstoff der Con A-spezifischen Amide (NC=O) lässt sich bei einer Bindungsenergie von 288.1 eV (19.5 Flächen-%) bestimmen.

Neben den hochauflösenden C1s-Spektren wurden ebenfalls N1s-Spektren aufgenommen (Abbildung 41b). Das N1s-Spektrum zeigt eine dominierende Komponente bei 400.6 eV welche mit Stickstoff in Amin- und Amidbindungen interpretiert wird. Im Übersichtsspektrum wird ein Gesamt-Stickstoff-Anteil von 10.5 At-% bestimmt (Anhang 6). Das hochaufgelöste N1s-Spektrum wurde in drei Komponenten-Kurven angepasst. Neben der $\text{NH}_3^+/\text{H-NH}_2$ Komponente bei 401.9 eV (10.3 Flächen-%), wird N- R_3 (tertiäres Amin)/ NC=O als Hauptkomponente bei 400.6 eV (87.6 Flächen-%) erhalten. Diese ist den Amino- und Amidgruppen des Lektins Concanavalin A zuzuordnen. Sekundäre und tertiäre Amine und Amide überlagern sich im Bindungsenergiebereich 400 ... 401 eV^[239]. Aus diesem Grund ist eine Unterscheidung der Amino- und Amidgruppen nur schwer möglich. Die Stickstoffkomponente bei 403.1 eV deutet auf Verunreinigungen hin.

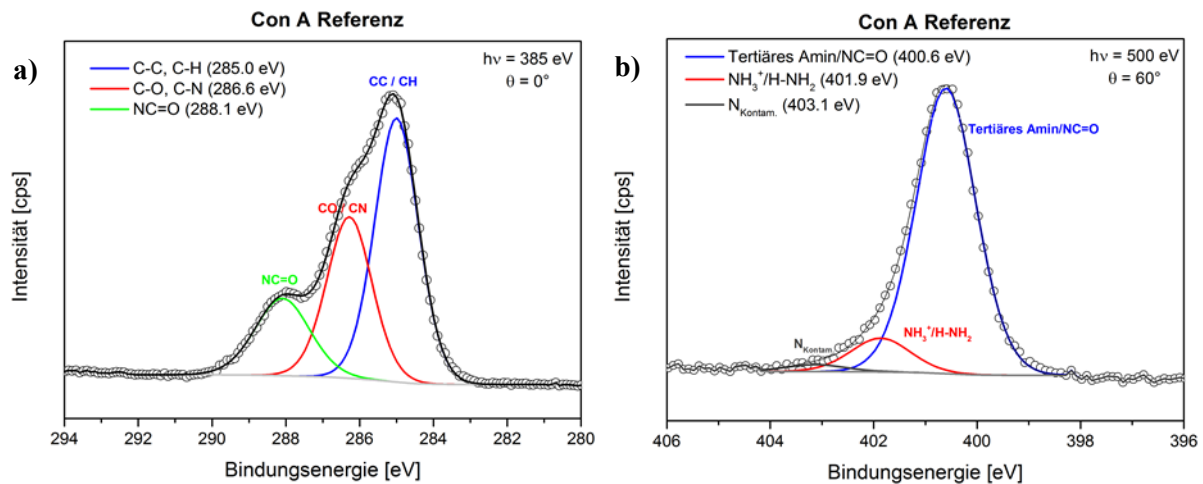


Abbildung 41: Synchrotron XPS C1s (a) und N1s (b) Spektren einer Concanavalin A-Referenzprobe ($h\nu = 385$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von 1.1 nm).

Zum Nachweis von Amidbindungen in Concanavalin A wurden die N- und C-K-Absorption-Kanten mit NEXAFS untersucht (Abbildung 42). Von besonderer Bedeutung für den Nachweis der Amidgruppen (NC=O) des Concanavalin A ist der Bereich um 288.0 eV im C K-NEXAFS-Spektrum (Abbildung 42a) und um 401.0 eV im N K-NEXAFS-Spektrum (Abbildung 42b), in denen die entsprechenden π^* -Resonanzen deutlich sichtbar sind. Weiterhin sind im C K-NEXAFS-Spektrum π^* -Resonanzen bei 285.0 eV zu erkennen, die den Phenyleinheiten der Aminosäuren des Lektins Con A zugeordnet werden (Abbildung 42a). Um 293.0 eV sind die Signale der C1s σ^* Resonanzen der C-N und C-C-Bindungen des Lektins Con A zu sehen. Eine CH*-Resonanz ist als Schulter bei 287.6 ... 287.9 eV zu erkennen, die den aliphatischen Kohlenstoff in den Aminosäuren des Lektins Con A repräsentiert. Zusätzlich sind im C K-NEXAFS-Spektrum Signale der Kalium-L-Kante bei 297 eV und 300 eV zu erkennen, die von der Pufferlösung des Lektins herrühren^[240]. Im N K-NEXAFS-Spektrum sind neben der scharfen Amid π^* Resonanz^[241-242] die σ^* Resonanz der C-N Bindungen des Lektins sichtbar (Abbildung 42b).

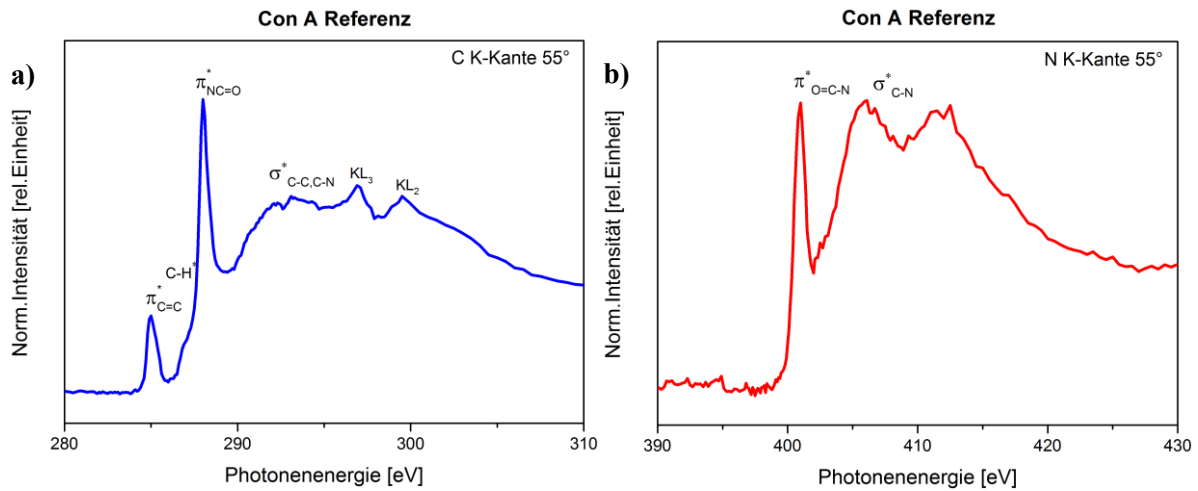


Abbildung 42: C K-NEXAFS (a) und N K-NEXAFS (b) -Spektren einer Concanavalin A Referenzprobe.

4.5.2 Charakterisierung von Glykan-Con A Interaktionen

Aufgrund der hohen Oberflächenaffinität von Concanavalin A zu Epoxid-funktionalisierten Oberflächen wurde ein Deaktivierungsschritt für die nach der Glykan-Immobilisierung verbliebenen Epoxide erforderlich. Dafür wurde Ethanolamin (EA) als Reagenz ausgewählt. Die Ergebnisse eines Experiments, in dem die deaktivierende Wirkung des Ethanolamins oberflächenanalytisch mit XPS überprüft wurde, sind in Tabelle 8 dargestellt.

Im XPS Übersichtsspektrum (Anhang 7) beobachtet man nach der Inkubation von Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen mit Con A eine hohe Signalintensität für N1s bei 399.0 eV (5.6 At-%). Erwartungsgemäß zeigt die Epoxidoberfläche eine hohe Affinität zum Lektin Con A. Nach Inkubation sind im hochaufgelösten C1s Spektrum folgende Komponenten sichtbar: C-C Bindungen bei einer Bindungsenergie von 285.0 eV, bei 286.6 eV C-O- und C-N-Bindungen und die das Amid (NC=O) repräsentierende Komponente (9.6 Flächen-%) bei 288.4 eV, die wesentlich auf immobilisiertes Con A zurückzuführen ist.

Oberfläche	Oberflächenkonzentration [#]				Relative Peakfläche der C1s Komponenten*			
	[Atom-%]				[Flächen-%]			
	C	N	O	Si 2p	CC/CH	CO/CN	NC=O	C _{cont.}
Epoxid (1)	35.7	–	38.7	26.6	48.5	46.1	3.0	2.4
Epoxid + Con A	41.9	5.6	30.3	22.2	57.1	32.1	9.6	1.3
Epoxid + EA + Con A	30.4	2.2	45.1	22.3	72.4	19.8	4.9	2.8

* Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al K α (1486.6 eV)

Tabelle 8: Elementzusammensetzung und Oberflächenkonzentrationen von Epoxidoberflächen nach Interaktion mit Concanavalin A, jeweils ohne und mit Absättigung freier Epoxidgruppen mit Ethanolamin (EA), sowie relative Peakflächen der C1s Komponenten in den hochaufgelösten XP Spektren.

Weiterhin erfolgte die Inkubation mit Concanavalin A nach der Blockierung der Epoxidgruppen mit Ethanolamin. Im XPS Übersichtsspektrum (Anhang 8) ist eine deutlich geringere Signalintensität für Stickstoff bei 399.0 eV (2.2 At-%) zu beobachten (Tabelle 8). Die C-C Komponente und die C-O/C-N Komponenten im hochaufgelösten C1s Spektrum zeigen deutliche Unterschiede ihrer relativen Flächenanteile im Vergleich zu den Epoxidoberflächen. Die Intensität der Amidkomponente bei 288.4 eV (4.9 Flächen-%) ist im Vergleich zum vorherigen Experiment deutlich geringer (Tabelle 8). Die Ethanolaminbehandlung der Epoxidoberfläche verhindert also nachweislich die unspezifische Con A Adsorption (Abbildung 43b).

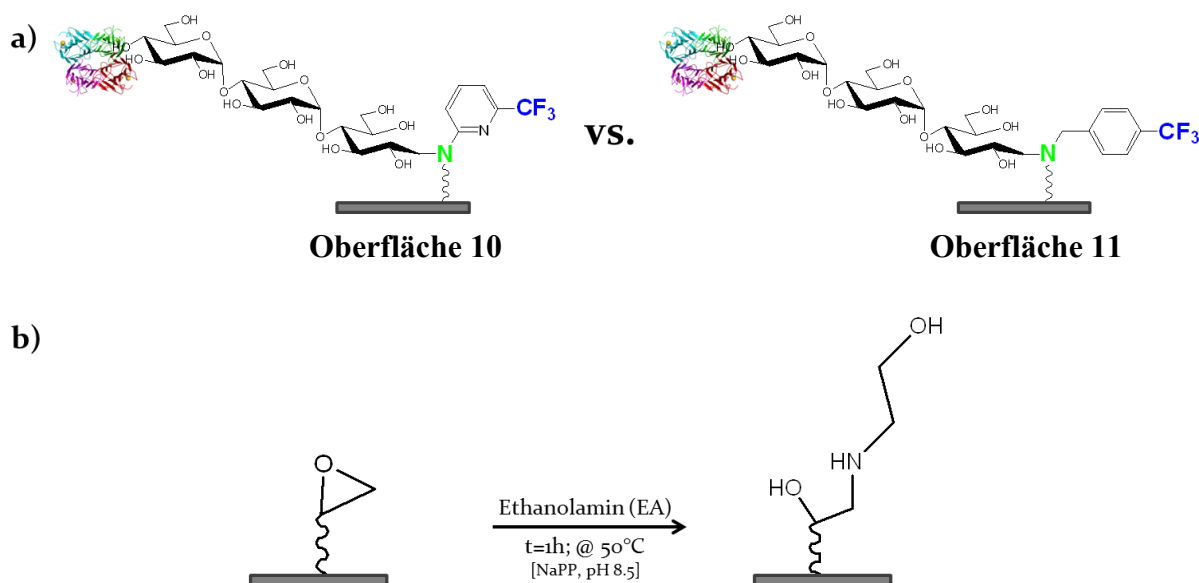


Abbildung 43: Schema der Con A Inkubation mit fluorierten Glykanen auf Epoxidoberflächen (a) Die Blockierungsreaktion der verbliebenen Epoxidgruppen ist ebenfalls dargestellt (b).

Im Glykan-Con A Interaktionsexperiment wurden die immobilisierten Glykane nach Deaktivierung der noch verbliebenen aktiven Epoxidgruppen (Oberflächen 10 und 11) mit dem Lektin Con A inkubiert (Abbildung 43a).

In den hochaufgelösten XPS Kohlenstoffspektren (Abbildung 44) findet man eine intensive C1s Komponente bei 285.0 eV, die die C-C Bindungen der aliphatischen und aromatischen Einheiten des Aminolinkers der Glykane (Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA) und des Lektins Concanavalin A repräsentiert (Abbildung 44). Bei einer Bindungsenergie von 286.3 eV erscheinen die C-O- und C-N-Komponenten aus den Glykanen und dem Lektin Con A.

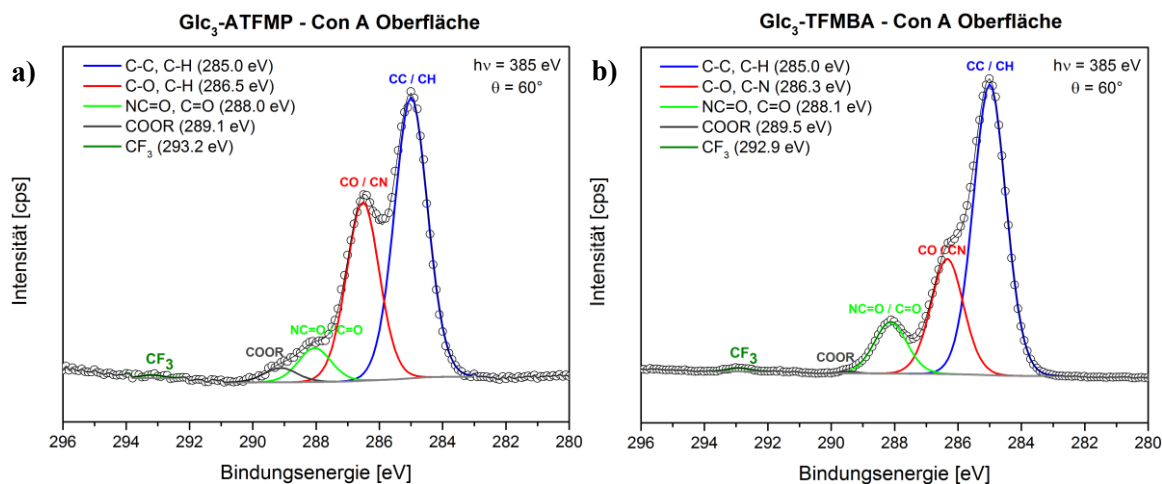


Abbildung 44: Hochaufgelöste XPS C1s Spektren der Glc₃-ATFMP-Con A-Oberfläche **10 (a)** und Glc₃-TFMBA-Con A und **11 (b)** ($h\nu = 385 \text{ eV}$, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm).

Eine Amid C1s-Komponente wird bei Bindungsenergien von $\sim 288.0 \text{ eV}$ gemessen und hauptsächlich dem Con A Molekül zugeordnet (vgl. auch das XPS C1s Referenzspektrum von Concanavalin A in Abbildung 41a), d.h. eine erfolgreiche Interaktion der Con A –Moleküle mit den Glucoseinheiten der fluorierten Glykane auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen darf vermutet werden, bedarf aber weiterer unabhängiger Beweise. In Abhängigkeit von der Art des Glykans, Glc₃-ATFMP oder Glc₃-TFMBA, sind die Intensitäten der NC=O-Komponente jedoch unterschiedlich, die Interaktionen des Con A mit den Glykan-Oberflächen dementsprechend auch deutlich verschieden bezüglich der Ausbeute.

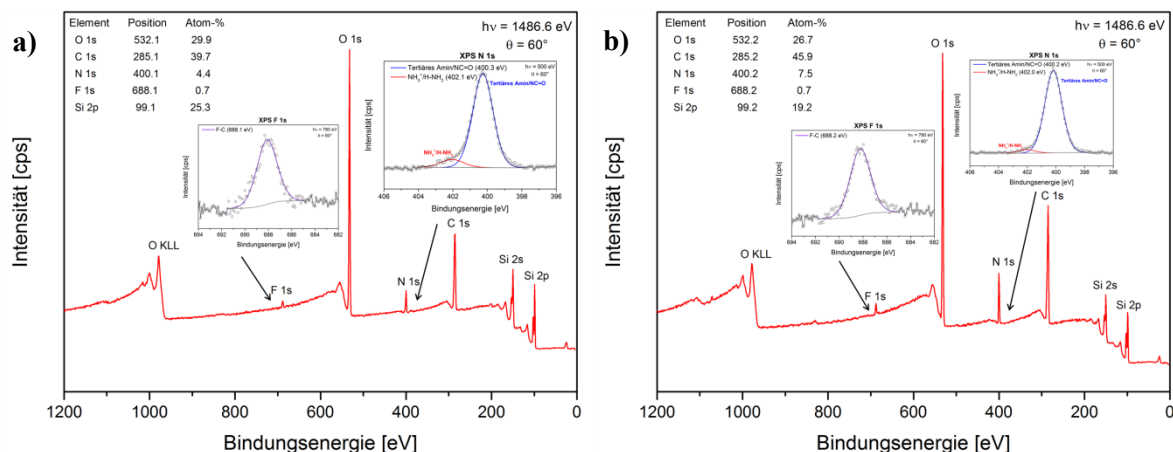


Abbildung 45: XPS Übersichtsspektren (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöste Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780 \text{ eV}$ und 500 eV , HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 1.1 nm) der Glc₃-ATFMP-Con A-Oberflächen **10 (a)** und Glc₃-TFMBA-Con A-Oberflächen **11 (b)** nach der Interaktion mit den Lektinen Con A.

Für die Glc₃-ATFMP-Con A-Oberfläche (Abbildung 44a) zeigt die Amidbindung (NC=O-) einen Anteil von 6.7 Flächen-% während für die Glc₃-TFMBA-Con A-Oberfläche (Abbildung 44b) ein Anteil von 11.1 Flächen-% gemessen wird. Die gleichen Schlussfolgerungen können aus den quantifizierten XPS-Übersichtsspektren (Abbildung 45) gezogen werden.

Das Signal bei 400 eV wird der Stickstoffkomponente des Aminolinkers der Glykane Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA bzw. den Amino- und Amidgruppen des Lektins Con A zugeordnet. Im Vergleich zu den Glykan-Oberflächen (Oberflächen **8** und **9**) ist ein signifikanter Anstieg des Stickstoffsignals nach der Inkubation mit Con A zu verzeichnen. Für die Glc₃-ATFMP-Con A-Oberfläche zeigt die Stickstoffkomponente einen Anteil von 4.4 At-% (0.9 At-% für Glc₃-ATFMP-Oberflächen) während die Glc₃-TFMBA-Con A-Oberfläche einen Anteil von 7.5 At-% (1.1 At-% für Glc₃-TFMBA-Oberflächen) verzeichnet (Tabelle 9, Abbildung 45a und b).

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#]					C1s Komponenten der Peakfläche [*]				
	[Atom-%]					[Flächen-%]				
	C	N	O	Si 2p	F	CC/CH	CO/CN	NC=O/O-C-O	C _{cont.}	CF ₃
Glc ₃ -ATFMP-EA-ConA (10)	39.7	4.4	29.9	25.3	0.7	55.1	35.0	6.7	2.8	0.5
Glc ₃ -TFMBA-EA-ConA (11)	45.9	7.5	26.7	19.2	0.7	63.1	25.0	11.1	0.3	0.5

^{*} Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al K α (1486.6 eV)

Tabelle 9: Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und relative C1s Komponentenpeakflächen von Siliziumoberflächen nach der Immobilisierung der fluorierten Maltotriose, Blockierung der verbliebenen Epoxidgruppen und anschließender Con A Inkubation (Oberflächen **10** und **11**).

Die hochaufgelösten N1s-Spektren (Abbildung 45) wurden mit zwei Komponenten angepasst. Neben eine Minoritäts NH₃⁺/H-NH₂ Komponente bei 402.0 eV wird eine N-R₃ (tertiäres Amin)/NC=O Hauptkomponente bei 400.2 eV mit 91.2 Flächen-% für Glc₃-ATFMP-Con A-Oberflächen und 95.9 Flächen-% für Glc₃-TFMBA-Con A-Oberflächen gefunden. Die für Concanavalin A charakteristischen Amin- und Amidkomponenten (N-R₃/NC=O) bei ~400 eV des Referenzspektrums (Abbildung 41b) werden gefunden und ein weiterer Beweis für eine erfolgreiche Interaktion ist erbracht.

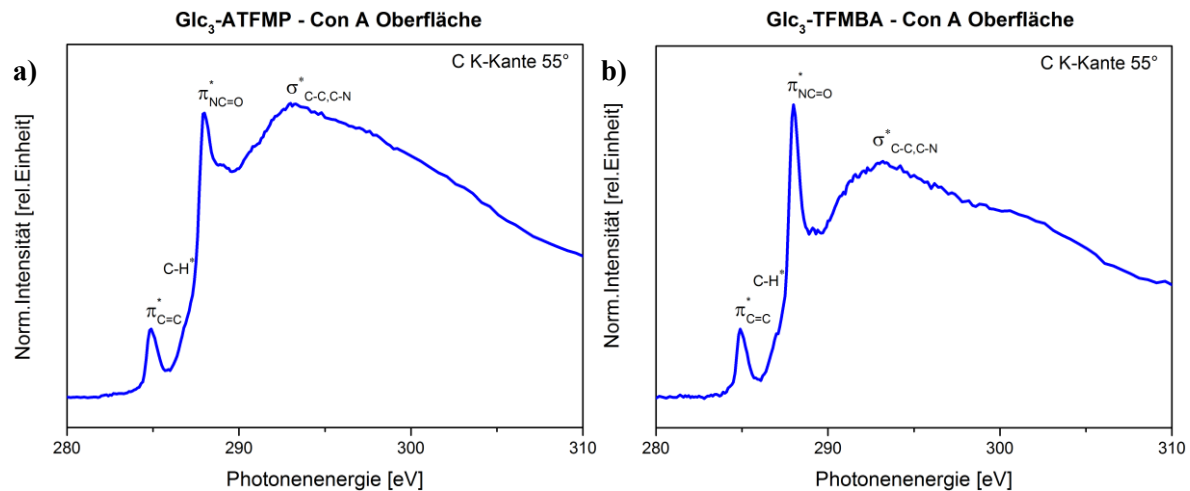


Abbildung 46: C K-NEXAFS Spektren von Glc₃-ATFMP-Con A-Interaktion 10 (a) und Glc₃-TFMBA-Con A-Interaktion 11 (b).

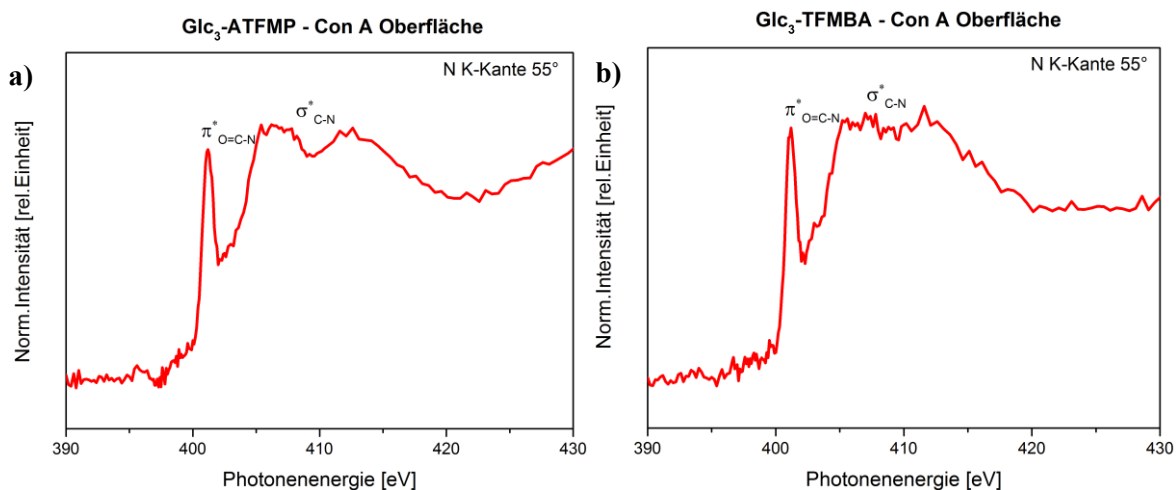


Abbildung 47: N K-NEXAFS Spektren von Glc₃-ATFMP-Con A-Interaktion 10 (a) und Glc₃-TFMBA-Con A-Interaktion 11 (b).

Weiterhin wurden NEXAFS-Spektren von den Glykan-Con A-Oberflächen (Oberflächen 10 und 11) aufgenommen. Da diese Methode sehr empfindlich für die ungesättigten Bindungen ist, kann ein weiterer unabhängiger Beweis für eine erfolgreiche Glykan Lektin Interaktion auf der Grundlage der Amidbindungen (NC=O) des Lektins Concanavalin A erwartet werden. Die Abbildungen 46 und 47 zeigen die Spektren der Kohlenstoff- und Stickstoff-K-Kanten nach der Interaktion des Lektins Con A mit den beiden verschiedenen Glykan-Oberflächen, bei denen jeweils die freien Epoxidgruppen mit Ethanolamin deaktiviert wurden.

Das Spektrum der Kohlenstoff K Kante zeigt nach der Interaktion von Con A mit der Glc₃-ATFMP-Oberfläche alle zu erwartenden Signale (Abbildung 46a). Für die Con A charakteristischen Amidbindungen (NC=O) ist der Bereich um 288.0 eV von Interesse, in dem die entsprechende C1s $\rightarrow \pi^*$ -Resonanz auftritt. Diese Resonanz tritt auch im Spektrum der Glc₃-TFMBA-Oberflächen nach Interaktion mit Con A auf (Abbildung 46b). Die Resonanz ist hier jedoch deutlich intensiver, was auf eine größere Oberflächenkonzentration von Amidspezies hindeutet. Bei einer Photonen-Energie von 285.0 eV ist die

C1s \rightarrow π^* -Resonanz der Elektronen aus sp^2 Kohlenstoffspezies zu finden (Abbildung 46). Diese sp^2 Kohlenstoffspezies sind Bestandteil der Phenyleinheiten der Aminosäuren des Lektins Concanavalin A. Beide Spektren enthalten CH*-Resonanzen zwischen 287.4 und 287.7 eV, welche den aliphatischen Ketten der Aminosäuren im Lektin Con A und denen im Linker-Molekül zugeordnet werden.

Zum unabhängigen Nachweis von Amidbindungen, die auf Grund der Interaktion des Lektins Con A mit den beiden Glykan-Oberflächen (Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA) auftreten, wurden auch die N Kanten spektroskopiert (Abbildung 47). Die ausgeprägte N1s \rightarrow π^* -Resonanz bei 401.2 eV ist für Amidbindungen charakteristisch. Die Intensität der Amid π^* -Resonanz ist bei der Glc₃-TFMBA-Glykan-Con A-Oberflächen nur geringfügig intensiver (Abbildung 47b) als die mit der Glc₃-ATFMP-Glykan-Con A-Oberfläche gemessenen Resonanz (Abbildung 47a).

Die in diesem Experiment gemessenen C und N Kanten NEXAFS Spektren sind gut vergleichbar mit denen der Referenzspektren des Concanavalin A (Abbildung 42a und b).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die NEXAFS Analysen die XPS Ergebnisse unabhängig bestätigen: Lektin Interaktionen mit Glykanoberflächen können mit den gewählten Oberflächenanalysemethoden eindeutig nachgewiesen werden. Die für die verschiedenen Glykan-Oberflächen, Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA, gefundenen Ausbeuteunterschiede deuten darauf, dass die Interaktionen der Con A Molekülen mit Glc₃-TFMBA-Glykan-Oberflächen deutlich höhere Ausbeuten erbringt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass durch die bessere Anbindung der Glc₃-TFMBA Moleküle auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen mehr Glucoseeinheiten mit Con A interagieren.

4.5.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass Lektine, in diesem Fall Concanavalin A, erfolgreich mit den Glucoseeinheiten fluorgelabelter Glykan-Oberflächen Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA (Oberfläche 8 und 9) interagieren. Nachweise dafür wurden mit XP- und NEXAFS-Spektroskopie erbracht, wobei sich der semi-quantitative Nachweis der mit den Lektin Con A eingeführten Amidgruppen als fruchtbar erwies. Die gewisse Mehrdeutigkeit beim qualitativen Nachweis der Amide mit XPS wurde durch den Einsatz von C-K- und N K-NEXAFS-Spektroskopie aufgehoben. Mit dieser Methode werden Amide eindeutig nachgewiesen. Die Nutzung von Con A Referenzspektren unterstützt die vorgestellten Interpretationen zusätzlich.

Die gewonnenen spektralen Daten der Glykan-Con A-Oberflächen sind hilfreich als Referenz für die Charakterisierung der Interaktionen des Lektins Con A mit anderen Glykan-basierenden Microarrays wie sie im nächsten Kapitel 4.6 besprochen werden.

Im Kapitel 4.6 steht die Charakterisierung von Modell-Glykan-Microarrays im Vordergrund. In vorangegangenen Kapiteln wurden immer Siliziumwaferoberflächen im Sinne eines Modells für Glasoberflächen benutzt. Die auf Siliziumchemie basierenden Prozessschritte werden sich nur geringfügig unterscheiden. Am Siliziumwafer Modell wird vereinfachend der Effekt von weiteren glastypischen Elementen wie Bor, Natrium, Kalium vernachlässigt. Dafür stellt sich der Vorteil ein, dass ein breiteres Spektrum von Charakterisierungsmethoden

verfügbar ist, z.B. XPS- und NEXAFS-Messungen am Synchrotronring BESSY II, die auf Glasoberflächen aus Aufladungsgründen nicht verfügbar sind.

4.6 Oberflächenanalytische Charakterisierung von Modell-Glykan-Microarrays

Nach der Untersuchung von Microarray-Modellen auf Siliziumwafer-Oberflächen steht nun die Charakterisierung von realen Glykan-Microarrays auf der häufig benutzten Glasoberfläche im Vordergrund. Die in den vorangegangenen Kapiteln entwickelten oberflächenanalytischen Methoden zur Charakterisierung von Microarray-Modellen kommen wieder zum Einsatz soweit das möglich ist. Die Gewährleistung von Qualität und Leistung von Microarrays soll durch eine valide chemische Charakterisierung der Produktionsstufen ‚Epoxid-funktionalisierter Träger‘ und ‚gespottete Glykanoberfläche‘ ermöglicht werden. Hierbei ist die Kontrolle der Art, Dichte und Verteilung der jeweiligen Funktionalgruppen bzw. Sondenmoleküle an der Oberfläche von substantieller Bedeutung für die erfolgreiche Immobilisierung der Zielanalyten.^[243, 244] Das bei Microarray-Herstellern häufig benutzte Prüfverfahren Fluoreszenzmikroskopie wird hierbei zusätzlich zu Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) und Flugzeit-Sekundärionen Massenspektrometrie (ToF-SIMS) eingesetzt.

4.6.1 Charakterisierung von Modell-Glykan-Microarrays

Für die Experimente auf Glastemplaten wurden die für die Siliziumoberflächen gewählten Parameter mit 3-Glycidoxypentyltrimethoxysilan (GOPTS) als Silanisierungsreagenz wiederverwendet (Abbildung 49b, Oberfläche 12). Die Glykane wurden ausgehend von Dextranhydrolysat mit einem speziellen Fluoreszenzmarker (2-Aminobenzamid) gelabelt und anschließend mittels HPLC fraktioniert, um Reste bzw. Rückstände des Eduktes Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) vollständig zu entfernen. Während der HPLC-Trennung hilft der Fluoreszenzmarker die Glykane zu erkennen^[245-246].

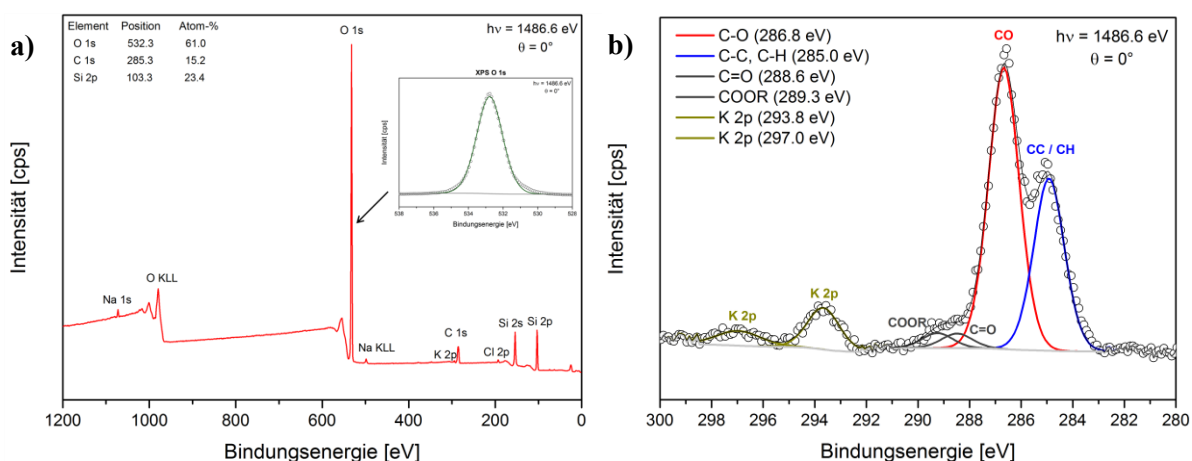


Abbildung 48: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes O1s-Spektrum (a) und XPS C1s Spektrum (b) einer GOPTS-funktionalisierten Glasoberfläche (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von ~ 10 nm).

Die XPS-Übersichtsspektren (siehe Beispiel in Abbildung 48a) zeigen die für ein Borosilikatglas typischen Elemente Silizium, Sauerstoff, Natrium und Kalium (vgl. auch).^[228] Erwartungsgemäß nimmt mit steigender Dichte der Epoxidgruppen die Kohlenstoffoberflächenkonzentration der funktionalisierten Glasoberfläche zu, während die

für Silizium (Hauptbestandteil des Glases) durch die immer stärker werdende Dämpfung der Substratphotoelektronen durch die dichter werdende Epoxidschicht zurückgehen. Neben XPS-Übersichtspektren wurden auch hochaufgelöste Spektren der O1s- und C1s- Regionen aufgenommen. Das O1s Spektrum (Abbildung 48a) ist allerdings wenig aussagekräftig, da sich die Photoelektronenspektren der sauerstoffhaltigen Funktionalgruppen und die des Glassubstrates untrennbar überlagern. Aus diesem Grund muss in den folgenden Experimenten auf eine detaillierte XPS Analyse der Sauerstoffregionen verzichtet werden.

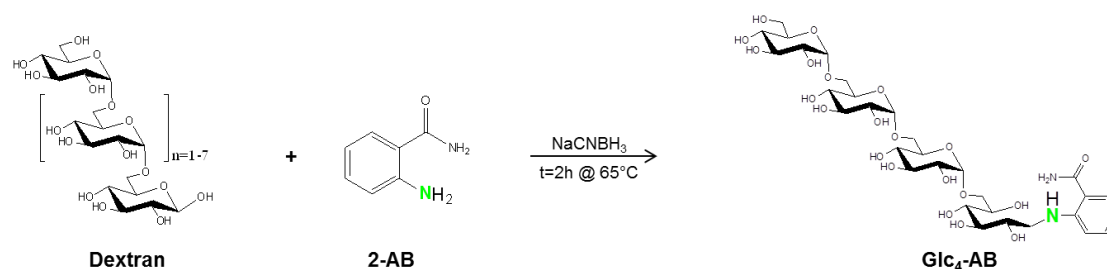
Zum Nachweis der organischen Kohlenstoff-Spezies Komponenten, wurden C1s XPS Spektren der Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen im hochaufgelösten XPS-Modus aufgezeichnet. Dominiert werden diese Spektren von einem Komponentenpeak bei 286.8 eV (siehe Abbildung 48b). Diese Bindungsenergien entsprechen typischerweise den Signalen der C-O Bindungen von organischen Kohlenstoffverbindungen. Die beste Anpassung der realen Messkurve erfolgt durch die Verwendung zusätzlicher Komponenten bei 285.0 eV, 288.6 eV und 289.3 eV, die C-C bzw. C-H, C=O und COOR Funktionalitäten zugeordnet werden. Unter dem C-O Komponentenpeak verbergen sich zwei Beiträge. Eine C-O-Komponente stammt vom Epoxidring und die zweite vom Ether in der GOPTS-Molekülkette. Die Komponenten bei 293.8 und 297.0 eV werden Kalium als Bestandteil der Glasoberfläche zugeordnet.

Bei den XPS-Messungen an Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen wurde eine Degradation des Epoxidpeaks (286.8 eV) mit steigender Exposition zur anregenden Röntgenstrahlung beobachtet^[228]. Aus diesem Grund wurde auch hier die Akquisitionszeit für die Spektren so kurz wie möglich gehalten. Es wurden nur maximal 3 Scans für die C1s XP Spektren akkumuliert.

Zur Bestimmung der Immobilisierungseffizienz von Glykan Sondenmolekülen auf frisch hergestellten Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen wurden spezielle Glucosederivate mit Aminolinker verwendet. Diese wurden in der AG Blanchard (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité) synthetisiert und dienen als Modell für weitere Glykane in Microarray Anwendungen.

Die Reaktion der Glykane mit Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen basiert darauf, dass aromatische Amine mit Aldehydgruppen, hier mit denen der Hexose des Glykans unter Abspaltung von Wasser Schiffsche Basen bilden. Dabei reagiert je ein Molekül 2-Aminobenzamid mit dem reduzierenden Ende jedes Glykans (Abbildung 49a). Die Zugabe des starken Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid reduziert die Schiffsche Base zu einem sekundären Amin.

a)



b)

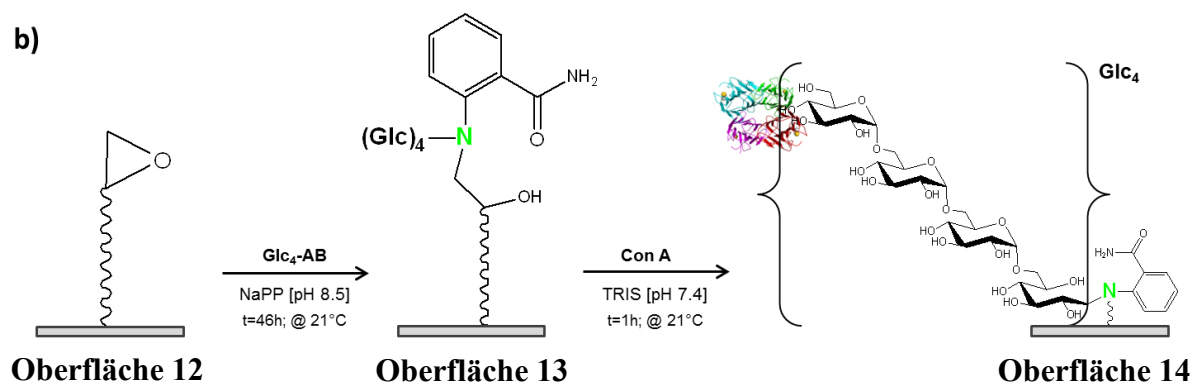


Abbildung 49: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung von Dextranhydrolysat mit 2-Aminobenzamid (2-AB) (a); Reaktionsschema der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von Glc₄-AB und anschließender Con A Inkubation (b).

Diese Glykane (Glc₄-AB und Glc₅-AB) wurden auf Epoxid-funktionalisierte Glasoberflächen als 250 µm große Spots gedruckt. Um überlagerte Alterungseffekte zu vermeiden wurden die Epoxidoberflächen in den Experimenten immer frisch hergestellt. Mit Hilfe des Aminolinkers der Glykane findet eine kovalente Anbindung an die Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen statt (Abbildung 49b, Oberfläche 13). Für die XPS Messungen wurde ein spezielles Druck-Layout gewählt, dass den Epoxid Hintergrund der unbedruckten Oberfläche minimiert. Jeweils 15 Spots der Glykane pro Array wurden eng benachbart gespottet wie in Abbildung 50c dargestellt. Der Spot Durchmesser betrug 250 µm und der Spot zu Spot Abstand 300 µm. Bei einem Field of View des XPS-Geräts von 300 x 700 µm² werden so etwa 15 Spots (3 x 5 Spots) für eine Analyse erfasst. Das Gerät würde eine Einzelspotanalyse zulassen. Dabei würde sich jedoch die Messzeit stark erhöhen und ein Strahlenschaden wäre zu befürchten. Deshalb wurde die oben dargestellte Messstrategie gewählt.

Grundsätzlich ist die Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche individueller Spots mit abbildender hochauflösender XPS aber möglich (Abbildung 50). Mithilfe des bildgebenden Modus des KRATOS XPS Gerätes wurden die bei ausgewählter Bindungsenergie gemessenen Glykanspots dargestellt. Dafür wurde z.B. die Bindungsenergie der Stickstoffkomponente (N1s), die zum Aminolinker der Glykane gehört, genutzt. XPS im abbildenden Modus zeigt klar, dass die Glykane tatsächlich im gedruckten Spot lokalisiert sind. Die Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche individueller Spots ist auch mit abbildender ToF-SIMS Analyse möglich und wird im Kapitel 4.6.4 vorgestellt.

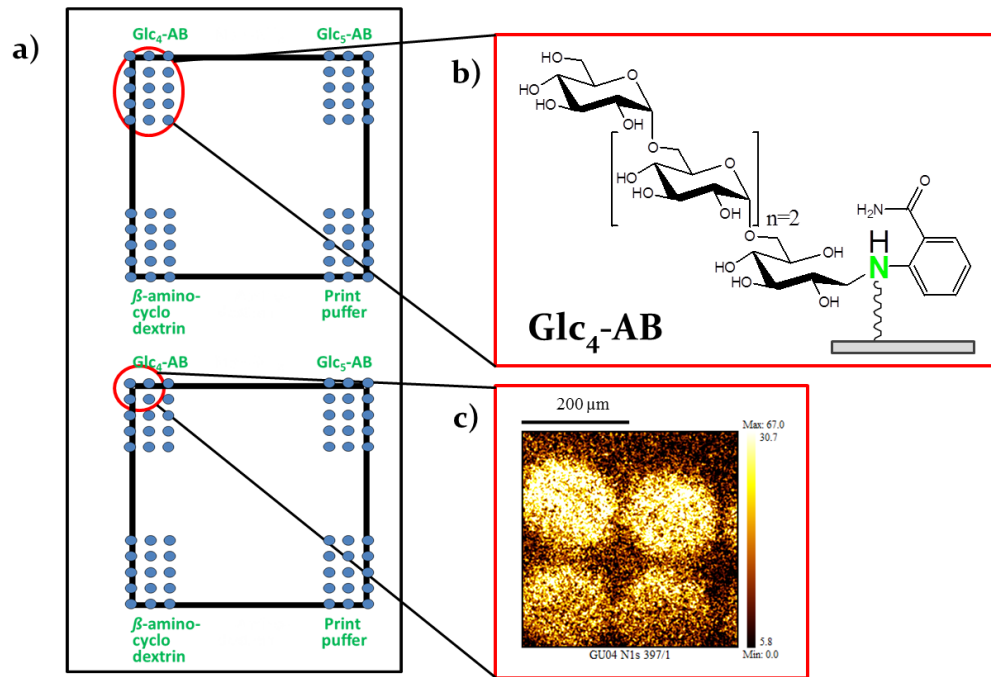


Abbildung 50: Microarray Layout mit dicht benachbarten Spots für die XPS-Messungen (a), Glucosederivat immobilisiert mit Aminolinker (b) und Glykanspots (Glc_4-AB) gemessen im XPS Abbildungsmodus für N1s Photoelektronen (c).

Die bedruckten Substrate wurden in eine Feuchtekammer überführt. Nach 2 Tagen Lagerzeit wurde der Immobilisierungsschritt beendet.

Die XPS-Messung der frisch gespotteten Oberflächen erfolgte direkt nach der Immobilisierungsphase der Glykan Sondenmoleküle. Die Lagerungszeit der Glykan-Microarrays an Umgebungsluft bis zur Charakterisierung lag bei maximal 30 Minuten. Bei der Vermessung der ungewaschenen Glykanspots wurden die Glykane problemlos mit XPS nachgewiesen. Es lässt sich deutlich der Stickstoff-Peak bei 400.3 eV (3.0 Atom-%) erkennen, der durch die Glykan Moleküle auf der Epoxid-funktionalisierten Glasoberfläche zustande kommt (Tabelle 10, Anhang 9).

Hochaufgelöste XPS Kohlenstoff Detailspektren wurden aufgenommen und analysiert. Wie aus der Abbildung 51a zu erkennen ist, werden hier die für Glykan Moleküle typischen C1s Komponenten nachgewiesen. So hat die Glykan-Behandlung im Vergleich zur Epoxid-funktionalisierten Glasoberfläche eine deutliche Abnahme der Intensität der C-C-Kohlenstoff-Komponente (285.0 eV) von 36.8 auf 31.8 Flächen-% zur Folge. Zugleich nimmt die Intensität der C-O Komponente bei 286.3 eV von 41.7 auf 59.7 Flächen-% zu. Auch diese Veränderungen sprechen für die Kopplung der Glykan Moleküle. Darüber hinaus wird die zusätzlich bei 288.3 eV auftretende Komponente dem Acetalkohlenstoff (O-C-O) der Glykane zugeordnet. Zusätzliche COOR Komponenten bei 289.3 eV werden geringfügigen Verunreinigungen (<2%) zugeordnet.

Um restliche, nicht gebundene Glykane zu entfernen und die nur fest gebundenen Glykane zu erfassen erfolgte nach erfolgreicher Glykanimmobilisierung ein Waschschriff in Natriumphosphatpuffer. Neben einem quantifizierten Übersichtsspektrum wurden hochaufgelöste N1s und C1s Detailspektren aufgenommen und analysiert (Abbildung 51b und

52). Im hochauflösten XPS N1s Spektrum erscheinen zwei Komponenten, bei 400.5 eV und 401.7 eV, die einerseits den überlagerten Signalen der Amino- und Amidgruppen und andererseits protonierten Funktionalitäten repräsentieren (Abbildung 52).

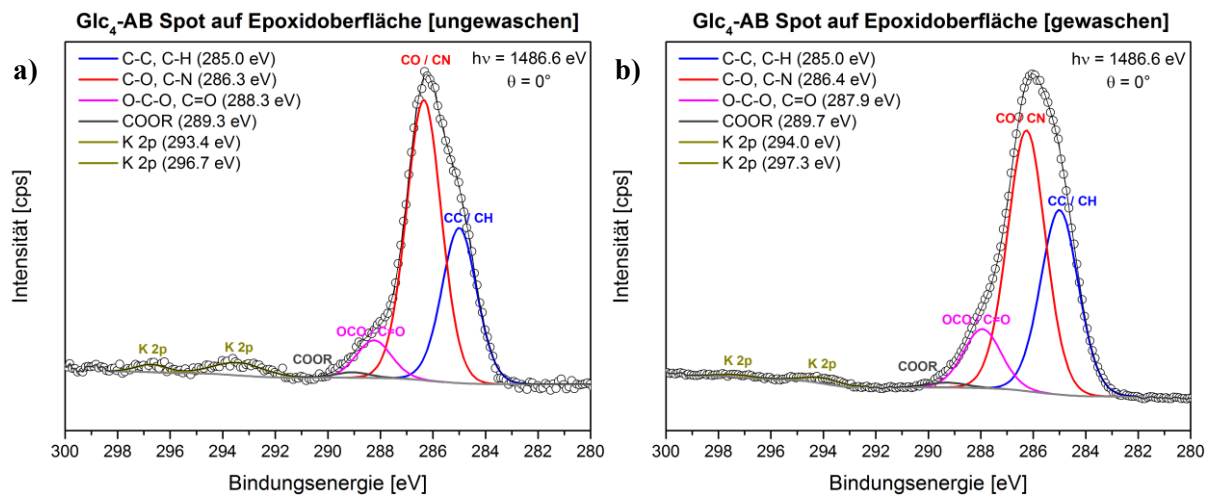


Abbildung 51: XPS C1s Spektrum einer Glc₄-AB-immobilisierten Glasoberfläche vor (a) und nach dem Waschen in Natriumphosphatpuffer (b) (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe $\sim 10 \text{ nm}$).

Das hochauflöste XPS C1s Spektrum zeigt die Acetal- und C-O-Komponenten bei 287.9 eV sowie 286.4 eV, die eindeutig die Glykane repräsentieren (Abbildung 51b). Der Peak bei 285.0 eV repräsentiert die aromatischen und aliphatischen C-C Funktionalitäten des Aminolinkers (2-AB) der Glykane bzw. des Epoxid-Linkers. Die gewaschenen Microarrays zeigen im Vergleich zu den Ungewaschenen eine deutliche Zunahme der relativen Intensität der O-C-O-Acetalspezies von 6.7 auf 15.0 Flächen-%. Die COOR-Komponentenpeaks bei 289.7 eV werden auf Kontaminationen zurückgeführt.

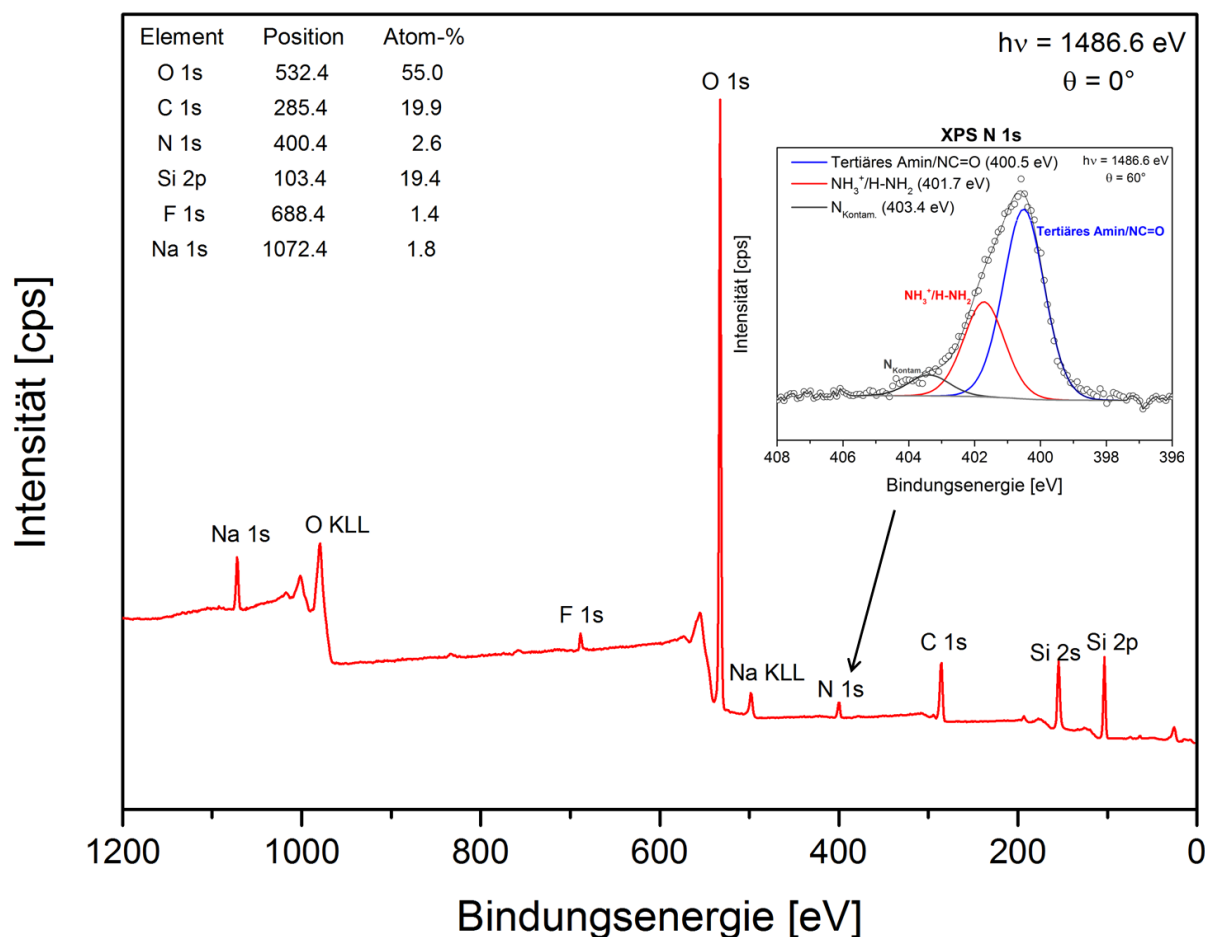


Abbildung 52: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes N1s-Spektrum einer Glc₄-AB funktionalisierten Glasoberfläche nach dem Waschen in Natriumphosphatpuffer (Al K α , h ν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).

Bei der Vermessung der gewaschenen Glykan Microarrays außerhalb des gespotteten Bereichs gab es keine Hinweise auf das Vorhandensein von Glykan Molekülen. Das XPS-Übersichtsspektrum (Anhang 10) zeigt die typischen Glasbestandteile Silizium, Sauerstoff, Natrium und Kalium. Zusätzlich zu einigen Peaks des Glaträgers finden sich auch Natrium- und Chlor-Anteile aus dem Puffer. Die relativ hohe Kohlenstoff-Oberflächenkonzentration verweist auf die Epoxid-Funktionalisierung.

Die XPS Übersichtsspektren der gewaschenen Glykanspots zeigen (Abbildung 52, Tabelle 10) deutlich reduzierte Stickstoff-Oberflächenkonzentrationen im Vergleich zu den ungewaschenen Glykanspots. Dies ist bedingt durch die Entfernung der nicht gebundenen Glykane im gespotteten Bereich.

Der Umsatz der Glc₄-AB-Moleküle wurde anhand der Stickstoffkomponente im XPS-Übersichtsspektrum ermittelt (Abbildung 52, Gleichung 3 in Kapitel 4.3.2). Der stöchiometrisch berechnete Wert des Stickstoffs der Glc₄-AB-Moleküle auf Epoxidoberflächen beträgt 3.0 At-%. Damit wird, ausgehend vom experimentell ermittelten Stickstoffwert von 2.3 At-%, die Immobilisierungseffizienz zu ~77% abgeschätzt. Mit Blick auf den Umsatz der Glc₃-TFMBA Moleküle, für die eine Stickstoff-basierte Reaktionsausbeute von 65% abgeschätzt wurde (Kapitel 4.4.3), ist die

Immobilisierungseffizienz der Glc₄-AB Moleküle im Rahmen der Messunsicherheit vergleichbar.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#]				C1s Komponenten der Peakfläche [*]			
	[Atom-%]				[Flächen-%]			
	C	N	O	Si 2p	CC/CH	CO/CN	O-C-O/C=O	C _{contam}
Epoxid (12)	15.2	–	61.0	23.4	36.8	41.7	6.9	4.2
Glc ₄ -AB [UW] (13)	21.1	3.0	54.7	20.0	30.5	57.2	6.4	1.7
Glc ₄ -AB [W]	19.9	2.6	55.0	19.4	30.3	51.6	15.0	0.8
Glc ₄ -AB [W] + EA + ConA (14)	24.4	3.9	51.6	16.9	56.4	24.3	13.1	0.6

^{*} Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al K α (1486.6 eV)

Tabelle 10: Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und relative Peakfläche der C1s Komponenten von Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen, vor und nach der Immobilisierung von Glc₄-AB und anschließender Con A Inkubation. [UW] und [W] bedeutet, dass ungewaschene und in Natriumphosphatpuffer gewaschene Microarrays analysiert wurden. EA bedeutet Ethanolamin.

4.6.2 Charakterisierung der Interaktionen von Lektinen mit Glykanspots

In diesem Kapitel wird die spezifische Interaktion zwischen gespotteten Glykanen und einem Modell-Analyten, dem Lektin Concanavalin A-Cy3 (Con A-Cy3), untersucht. Eine spezifische Interaktion befähigt eine analytische Methode, ausschließlich und eindeutig einen ausgewählten Analyten zu messen, ohne dass es zu einer Beeinflussung der Messung durch weitere, in der analysierten Probe enthaltene Bestandteile kommt^[247]. Bei der Verwendung eines Microarrays wären (unspezifische) Wechselwirkungen des Analyten mit der funktionalisierten Oberfläche in der Umgebung der Spots oder in nicht Inhomogenitäten der Spots z.B. unerwünscht, da sie das Ergebnis verfälschen oder den Messfehler vergrößern.

Aus diesem Grund erfolgt nach der Immobilisierung von Glykanen auf Epoxidoberflächen ein Blockierungsschritt mit Ethanolamin (vgl. auch Kapitel 4.5.2). Dieser dient der Deaktivierung noch aktiver Epoxidgruppen und damit der Verhinderung einer unspezifischen Adsorption von Concanavalin A-Cy3 mit freien Epoxidoberflächen.

Nach der Deaktivierung der verbliebenen freien Epoxidgruppen erfolgte die Interaktion des Lektins Con A-Cy3 mit den Glykan Molekülen (Glc₄-AB und Glc₅-AB) in den gespotteten Bereichen (Abbildung 49b, Oberfläche 14).

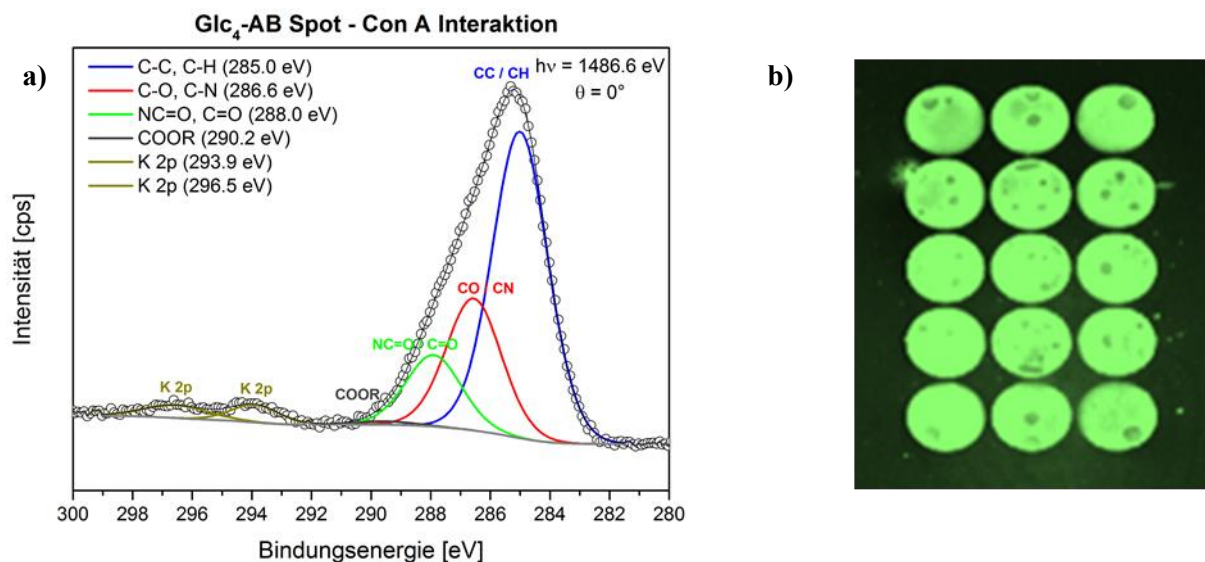


Abbildung 53: XPS C1s Spektrum ($Al\ K\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe $\sim 10 \text{ nm}$) einer Glc₄-AB funktionalisierten Glasoberfläche nach Con A Inkubation (a) und das entsprechende, mit einem Fluoreszenzscanner aufgenommene Bild (b).

Die sich anschließende XPS Analyse zeigte, dass das Lektin Con A-Cy3, der Modell-Analyt, durch eine Glucose-spezifische Interaktion mit den immobilisierten Glc₄-AB Molekülen erkannt wird. Dominiert wird das hochaufgelöste XPS C1s Spektrum von einem Hauptpeak bei 285.0 eV. Diese C-C/C-H-Komponente lässt sich den aliphatischen und aromatischen C-C-Funktionalitäten des Lektins Con A-Cy3 zuordnen (Abbildung 53a). Die Bindungsenergie des deutlich kleineren Peaks bei 286.6 eV entspricht den C-O- und C-N-Bindungen in den Glykaneinheiten der Glc₄-AB-Glykan Moleküle und den Aminosäureeinheiten des Lektins Con A. Das Vorhandensein eines neuen Komponentenpeaks bei einer Bindungsenergie von 288.0 eV (Amid) belegt die Präsenz des Lektins Con A-Cy3 auf der Glykan-Oberfläche. Die COOR-Funktionalitäten die mit geringer Intensität bei einer Bindungsenergie von 290.2 eV auftreten, resultieren aus Kontaminationen. Die Gesamtform des hochaufgelösten XPS C1s Spektrums ist sehr ähnlich zum zuvor gemessenen Con A Referenzspektrum (Kapitel 4.5, Abbildung 41)

Die erfolgreiche Interaktion der Lektine mit den Glykanspots wird vor allem durch das Vorhandensein des Stickstoffpeaks im XPS-Übersichtsspektrum (Abbildung 54, Tabelle 10) gestützt. Die Stickstoff-Oberflächenkonzentration zeigt einen deutlichen Anstieg (3.9 Atom-%) im Vergleich zu den Glykan-Oberflächen (2.6 Atom-%).

Im XPS-Übersichtsspektrum lassen sich zudem deutlich die erhöhten Kohlenstoff-Oberflächenkonzentration sowie die reduzierten substratspezifischen Sauerstoff- und Silizium-Oberflächenkonzentrationen erkennen, die eindeutig auf eine Erhöhung des abgeschiedenen organischen Materials auf der Glasoberfläche hinweisen. Dies ist ein Indiz für die erfolgreiche Interaktion der Lektine Con A-Cy3 mit den Glykan Sondenmolekülen im gespotteten Bereich.

Die hochaufgelösten N1s Spektren wurden mit drei Komponenten angepasst. Neben der $\text{NH}_3^+/\text{H}-\text{NH}_2$ Komponente bei 401.9 eV (29.1 Flächen-%), tragen tertiäres Amin überlagert

mit NC=O als Hauptkomponenten bei 400.4 eV mit 70.9 Flächen-% bei, die den Amino- und Amidgruppen des Lektins Con A-Cy3 zuzuordnen ist.

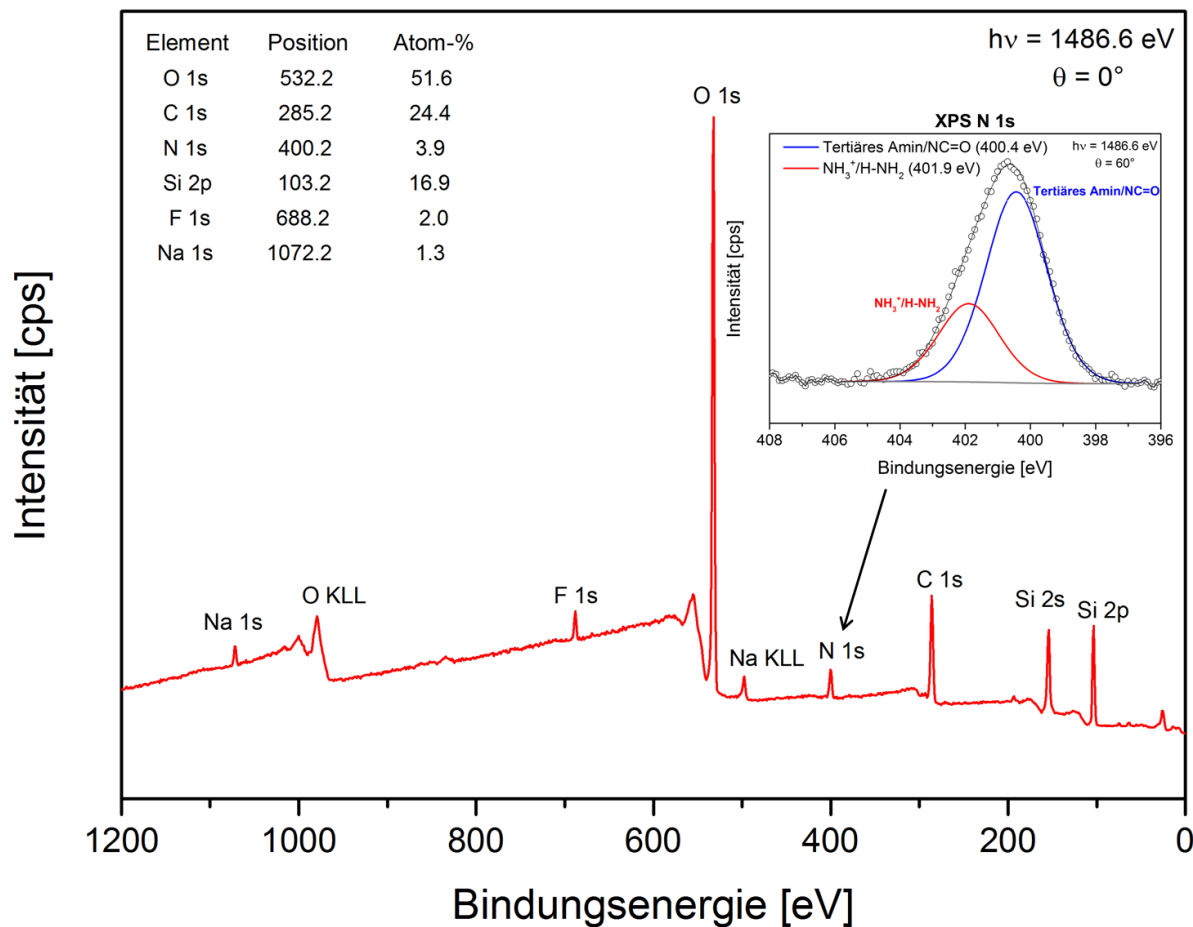


Abbildung 54: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes N1s-Spektrum einer Glc₄-AB-ConA-Interaktion (Al K α , h ν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).

Um eine Verbindung vom XPS zum Standardverfahren in der Microarray-Charakterisierung herzustellen wurde die Fluoreszenzanalyse ebenfalls eingesetzt. Da das Lektin mit einem Farbstoff markiert ist (Cy3), wird eine Detektion mittels Fluoreszenzscanner ermöglicht (Abbildung 53b). Nach der Con A Inkubation wurden die Glykanspots mit einem Fluoreszenzscanner ausgelesen und beweisen indirekt unter Nutzung der hohen Bindungsaffinität der Lektine Con A-Cy3 zu den Glc₄-AB Molekülen die erfolgreiche Anbindung unserer Glykan Moleküle auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen.

4.6.3 Alterungsverhalten von Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen

Eine wichtige Grundlage für die Anwendung Epoxid-funktionalisierter Glasoberflächen als primäres Templat in Microarray-Experimenten ist eine fundierte Kenntnis über deren Alterungsverhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Problem nach einer Hydrolyse und nach Lagerung bei ~60% Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank über einen Zeitraum von 160 Tagen mit der Photoelektronen-Spektroskopie und der Kontaktwinkel-Goniometrie untersucht.

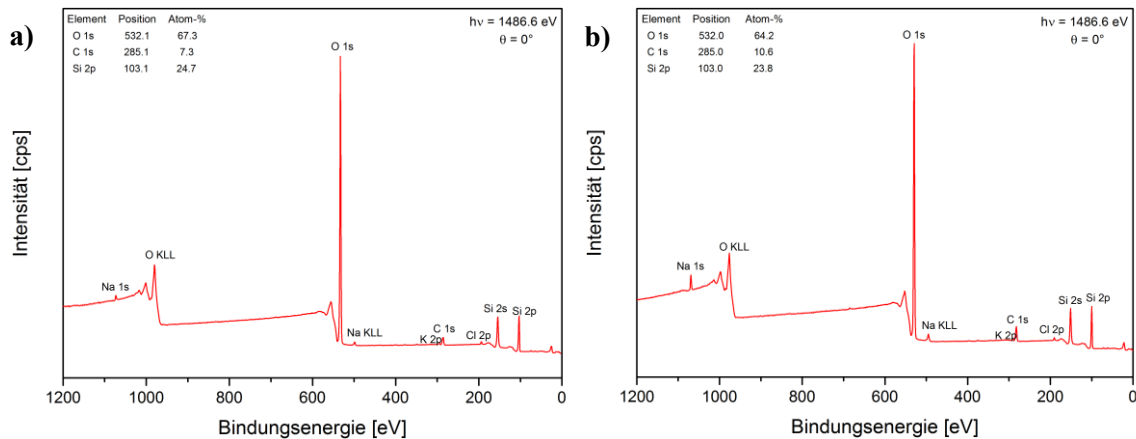


Abbildung 55: XPS Übersichtsspektren von GOPTS funktionalisierten Glasoberflächen nach der Hydrolyse (a) und nach 160 Tagen einer Lagerung bei 4°C und ~60% Luftfeuchtigkeit (b) (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).

Als Ursache für eine mögliche Veränderung der Oberflächen mit der Lagerzeit wurde die Hydrolyse von Epoxidgruppen durch Luftfeuchtigkeit vermutet^[248]. Die Hydrolyse der Epoxidgruppen führt durch die Ringöffnungsreaktion zu Diolen.

Der Einfluss von Wasser wurde nach Lagerung der GOPTS funktionalisierten Glasoberflächen im Wasserbad über 46 Stunden als Extremfall untersucht. Der Kontaktwinkel an einer frischen Epoxidoberfläche beträgt etwa $54^\circ \pm 2^\circ$. Nach der Lagerung im Wasserbad zeigt die Oberfläche eine starke Abnahme des Kontaktwinkels zu $31^\circ \pm 1^\circ$. Das XPS-Übersichtsspektrum (Abbildung 55a) charakterisiert die Oberfläche nach der Hydrolyse von Epoxidgruppen im Wasserbad. Der vergleichsweise zur frischen Epoxidoberfläche (Abbildung 48a) geringe Anteil von Kohlenstoff (7.3 Atom-%) und der hohe Anteil von Sauerstoff (67.3 Atom-%) im XPS-Übersichtsspektrum bestätigen die Hydrolyse der Epoxidgruppen auf der Glasoberfläche.

In einem realitätsnahen Test wurde eine Epoxid-funktionalisierte Glasoberfläche über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank gelagert um so den Einfluss der Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank auf die Stabilität der Epoxidgruppen zu untersuchen. Dafür wurde die Oberfläche für 160 Tage im Kühlschrank gelagert und anschließend die chemische Zusammensetzung mittels XPS untersucht. Nach 160 Tagen Lagerung im Kühlschrank lässt sich ein leichter Anstieg des Sauerstoffanteils der Epoxid-funktionalisierten Glasoberfläche im XPS-Übersichtsspektrum (Abbildung 55b) im Vergleich zu den Epoxidoberflächen

(Abbildung 48a) erkennen. Bei der Untersuchung zeigte sich zudem nur eine leichte Abnahme des Kontaktwinkels auf etwa $50.2^\circ \pm 1^\circ$.

Für eine für Microarray-Experimente typische Epoxid-funktionalisierte Glasoberfläche (hier GOPTS) wird geschlussfolgert, dass diese bei einer Luftfeuchtigkeit um 60% im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum stabil bleiben kann.

4.6.4 Langzeitstabilität von Glykan-Microarrays

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendung von Glykan-Microarrays ist ihre Lagerfähigkeit. Ein für die diagnostische Anwendung optimierter Glykan-Microarray muss über eine geprüfte Lagerzeit bei definierten Lagerbedingungen eine hohe und reproduzierbare (konstante) Bindungsaffinität für Target-Lektine zeigen.

Zur Beurteilung der Lagerfähigkeit von Glykan-Microarrays wurden Langzeitversuche durchgeführt. Zur Charakterisierung der definiert gelagerten Glykan-Microarrays wurden ToF-SIMS, XPS und Fluoreszenzmessungen eingesetzt. Neben chemischen Veränderungen könnten auch auftretende Konformationsänderungen der immobilisierten Glykane Auswirkungen auf die Avidität der Glykan-Protein-Wechselwirkung haben, was ebenfalls zu einem veränderten Signalverhalten der Glykan-Microarrays führen würde. Dieses Problem ist mit den vorhandenen Methoden der chemischen Oberflächenanalytik schwer zu bearbeiten. Deshalb wurden die verschiedenen Alterungszustände der Glykan-Microarrays durch Beobachtung der Con A-Bindungsleistung mittels Fluoreszenzanalyse getestet.

Für die Alterungsstudie wurden Glykan-Microarrays desselben Druckvorgangs bei unterschiedlichen Bedingungen und Zeiten gelagert und dann unter Beibehaltung des Versuchsprotokolls prozessiert. Es wurden zwei praktisch relevante Lagerungsbedingungen bezüglich der Con A-Bindungsleistung nach verschiedenen Lagerungszeiten geprüft. Parallel wurde die chemische Zusammensetzung der Glykan-Oberflächen mittels XPS- und ToF-SIMS-Analyse untersucht. Sowohl die ToF-SIMS- als auch die Fluoreszenzanalyse erfolgten nach 5, 10, 20, 40, 80 und 160 Tagen Lagerung. Die XPS-Messungen erfolgten jeweils nach 5 und 160 Tagen Lagerung.

Die Lagerbedingungen sind:

- Lagerung im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 4°C (Bedingung A)
- Lagerung im Exsikkator bei einer Temperatur von ca. 22°C (Bedingung B)

Die Glykan-Microarrays waren dabei - gruppiert nach Versuchstag – als Glasoberflächen lichtdicht in den herstellerseitig üblichen luftgefüllten Behältnissen verpackt.

Es wurden XPS Übersichtsspektren und hochaufgelöste Kohlenstoff Detailspektren der Glykan-Microarrays auf den Glasoberflächen aufgenommen und quantifiziert. Auch bei der langen Lagerdauer von 160 Tagen ergab sich im Vergleich zu den frisch gedruckten Glykan-Microarrays (Abbildung 56, Tabelle 11) keine Veränderung, weder in der Signalintensität der Glykankomponenten im hochaufgelösten Kohlenstoff-XPS-Spektrum noch im XPS-Übersichtsspektrum.

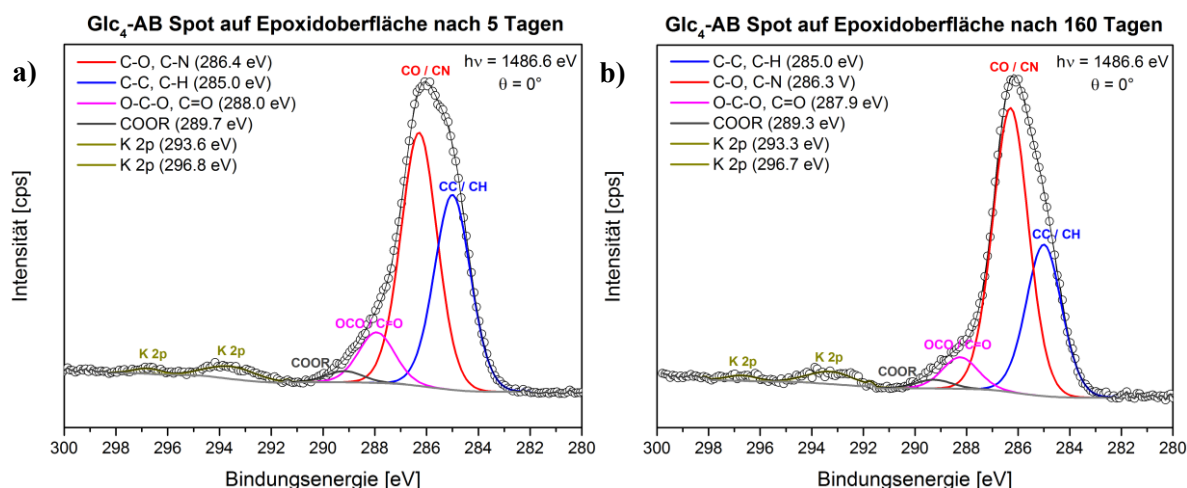


Abbildung 56: XPS C1s Spektrum Glc₄-AB-Spots auf Glasoberflächen nach 5 (a) und 160 Tagen (b) Lagerung bei 4°C ($h\nu = 1486.6$ eV, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).

Im Detail zeigen die Glykanoberflächen auf den Microarrays sowohl nach 5 Tagen als auch nach 160 Tagen Lagerung im Kühlschrank bei 4°C (Bedingung A) keine Unterschiede der für die Glykan-typischen Komponentenpeaks im hochaufgelösten C1s XPS-Spektrum (vgl. Abbildung 56b und Tabelle 11, Anhang 12 und 13). Die Glykan-Microarrays reproduzierten im Rahmen der Experimentiergenauigkeit auch nach 160 Tagen einer empfohlenen Lagerung entsprechend der Bedingung A die Signalintensitäten, die mit frisch gedruckten Microarrays erzielt wurden.

Oberfläche	Elementzusammensetzung [#]				Relative Peakfläche der C1s Komponenten [*]			
	[Atom-%]				[Flächen-%]			
	C	N	O	Si 2p	CC/CH	CO/CN	O-C-O/C=O	C _{contam.}
Epoxid (12)	15.2	—	61.0	23.4	36.8	41.7	6.9	4.2
T5_Glc ₄ -AB	20.1	2.9	52.5	21.3	31.5	52.2	13.8	0.9
T160_Glc ₄ -AB	19.9	2.8	54.9	19.3	35.5	47.9	11.6	1.0

^{*} Synchrotron XPS (385 eV); [#] Al Kα (1486.6 eV)

Tabelle 11: Elementzusammensetzungen (XPS Oberflächenkonzentrationen) und relative Peakflächen im hochaufgelösten C1s Spektrum für die Epoxid-funktionalisierte (GOPTS) Glasoberfläche 12 und die Glykanoberflächen (Glc₄-AB) 13 nach 5 und 160 Tagen Lagerung der Microarrays entsprechend der Lagerbedingung A.

Parallel wurde die deutlich oberflächensensitivere Methode ToF-SIMS in Kombination mit einer Datenreduktion durch PCA genutzt, um nach chemischen Veränderungen innerhalb der obersten 2-3 Monolagen der Glykan-Oberfläche zu suchen. Die ToF-SIMS Analyse von gedruckten Glykan-Microarrays auf Epoxidoberflächen stellt eine Herausforderung dar. Ein Grund ist der Mangel an größeren Sekundärfragmentationen, die charakteristisch für die Glykan-Oberflächen sind. Das Auftreten der doppelten Ringspaltung bei den Oligoglucoseringen führt zu vielen Sekundärfragmentationen im niedrigen Massenbereich, die

wenig spezifisch sind. Diese sind sowohl charakteristisch für die Fragmentierungsmuster der Glykane als auch die der Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen^[249-250]. Die ToF-SIMS-Untersuchungen der Glykan-Oberflächen wurden durch intensive Natrium-Spezies, die aus dem Natriumphosphatpuffer stammen, erschwert. Aus diesem Grund erfolgten weitere Waschschriffe der Glykan-Microarrays mit Wasser.

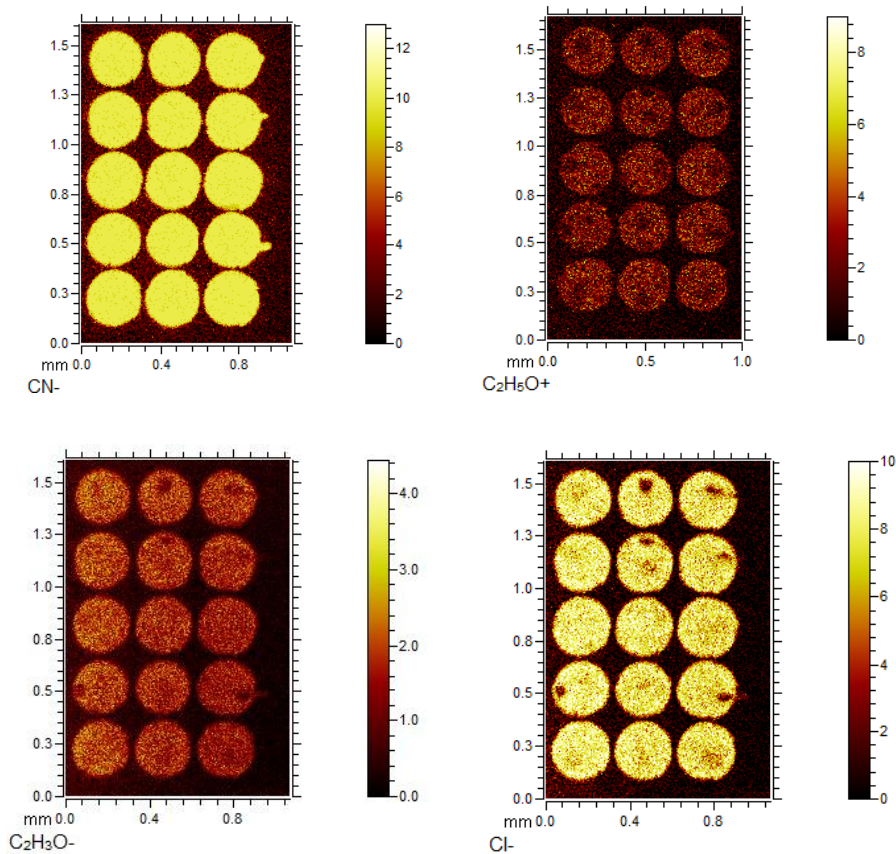


Abbildung 57: ToF-SIMS Abbildung eines Glykan Microarrays auf einer Glasoberfläche. CN^- wurde als Leitfragment der Glykane (hier $\text{Glc}_4\text{-AB}$) benutzt. Cl^- ist Bestandteil des Puffers.

ToF-SIMS im bildgebenden Modus ist befähigt, die Glykanspots auf dem Objektträger durch die Abbildung Glykan-spezifischer Fragmente zu identifizieren (Abbildung 57). Als Leitfragment für die Glykane wurde das CN^- Sekundärfragmention genutzt. Mit Hilfe von intensiven Sekundär(fragment)ionen, die auf Komponenten des Puffers zurückzuführen sind wie zum Beispiel Cl^- , kann ToF-SIMS auch die Binnenstruktur des Spots abbilden (Abbildung 57). Es zeigte sich, dass mit abbildender ToF-SIMS, die Verteilung gespotteter Glykan Moleküle auf Glastemplaten direkt darstellbar ist. Auf das Anbringen von Fluorophoren als Marker kann dabei verzichtet werden.

Aufgrund der großen Datenmenge, die in ToF-SIMS Analysen generiert werden, wurde eine multivariate Analyse, die Hauptkomponentenanalyse (PCA, englisch: Principal Component Analysis), erforderlich. Die PCA ist ein mathematisches Verfahren der multivariaten Statistik. Sie dient dazu, umfangreiche Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen, indem eine Vielzahl statistischer Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (die „Hauptkomponenten“) repräsentiert

wird. Diese Hauptkomponentenanalyse hat sich in der Datenreduktion in Anwendungen von ToF-SIMS als sehr nützlich erwiesen.

Zunächst wurde eine dem Problem angepasste Peakliste erstellt. Dafür wurden alle Peaks im Massenbereich $m/z = 0$ bis 200 zugeordnet und die für die Glykan-Oberfläche charakteristischen Sekundärionen selektiert^[251]. Alle Peaks, die dem Glas und anorganischen Verunreinigungen (z.B. Natriumphosphatpuffer) angehören, wurden dabei entfernt. Durch einen Vergleich mit Referenzspektren der Epoxidoberfläche wurde versucht typische Sekundärfragmentationen der Glykanmoleküle zu identifizieren (vgl. Anhang 14).

Für die ToF-SIMS/PCA Analyse der Glykanoberfläche **13** nach verschiedenen Lagerungsarten und -zeiten erfolgte eine weitere Filterung der Peakliste. Es wurden nur Peaks mit positiven Ladungen verwendet und unspezifische Sekundärfragmentationen (C_xH_y und $C_xH_yN_z$) sowie Silizium enthaltende Sekundärfragmentationen ($SiC_xH_yO_z$), die der Epoxidoberfläche **12** zuzuordnen sind, entfernt.

Die primären Ergebnisse der PCA der ToF-SIMS Daten für die gespotteten Glykan Oberflächen, die mit den Glykanen Glc₄-AB und Glc₅-AB hergestellt wurden, sind in einer Tabelle aufgeführt (siehe Anhang 14).

Die über die wiederholten Messungen (3x) gemittelten Scores für PC1, aufgezeichnet gegen die Lagerzeit (Abbildung 58a), zeigen für die Lagerungsbedingungen A und B sehr ähnliche Kurven. Nach ca. 40 Tagen werden keine Änderungen mehr beobachtet. Es wird vermutet, dass PC1 einen Alterungsprozess der nicht abreagierten Epoxide (Ringöffnungsreaktion zu Diolen) repräsentiert (Kapitel 4.6.3). Wie bereits diskutiert verhindert der sterische Anspruch der Glykane die Reaktion aller verfügbaren Epoxidgruppen in der gespotteten Glykanoberfläche **13**. Die gemittelten Scores für PC2, aufgezeichnet gegen die Lagerzeit (Abbildung 58b), zeigen für die Lagerungsbedingungen A und B ebenfalls sehr ähnliche Kurven. Der Peak bei den kurzen Lagerzeiten könnte mit einer strukturellen Umlagerung der Glykane in der Oberfläche verbunden sein. Eine Veränderung der Sekundärionenintensität ist oft mit einer Konformationsänderung des Moleküls in der analysierten Oberfläche verbunden. Die Konformationsänderung während der Lagerung der Glykanoberfläche könnte durch denkbare Wasserstoffbrückenbindungen der Amidgruppen des 2-AB-Linkers mit den Hydroxygruppen der Glykane verursacht sein.

Die Ergebnisse der ToF-SIMS Langzeit-Lagerstudien mit der Glc₅-AB Glykanoberfläche unterscheiden sich nicht von den gerade dargestellten Befunden für die Glc₄-AB Glykanoberfläche (Anhang 15, 16).

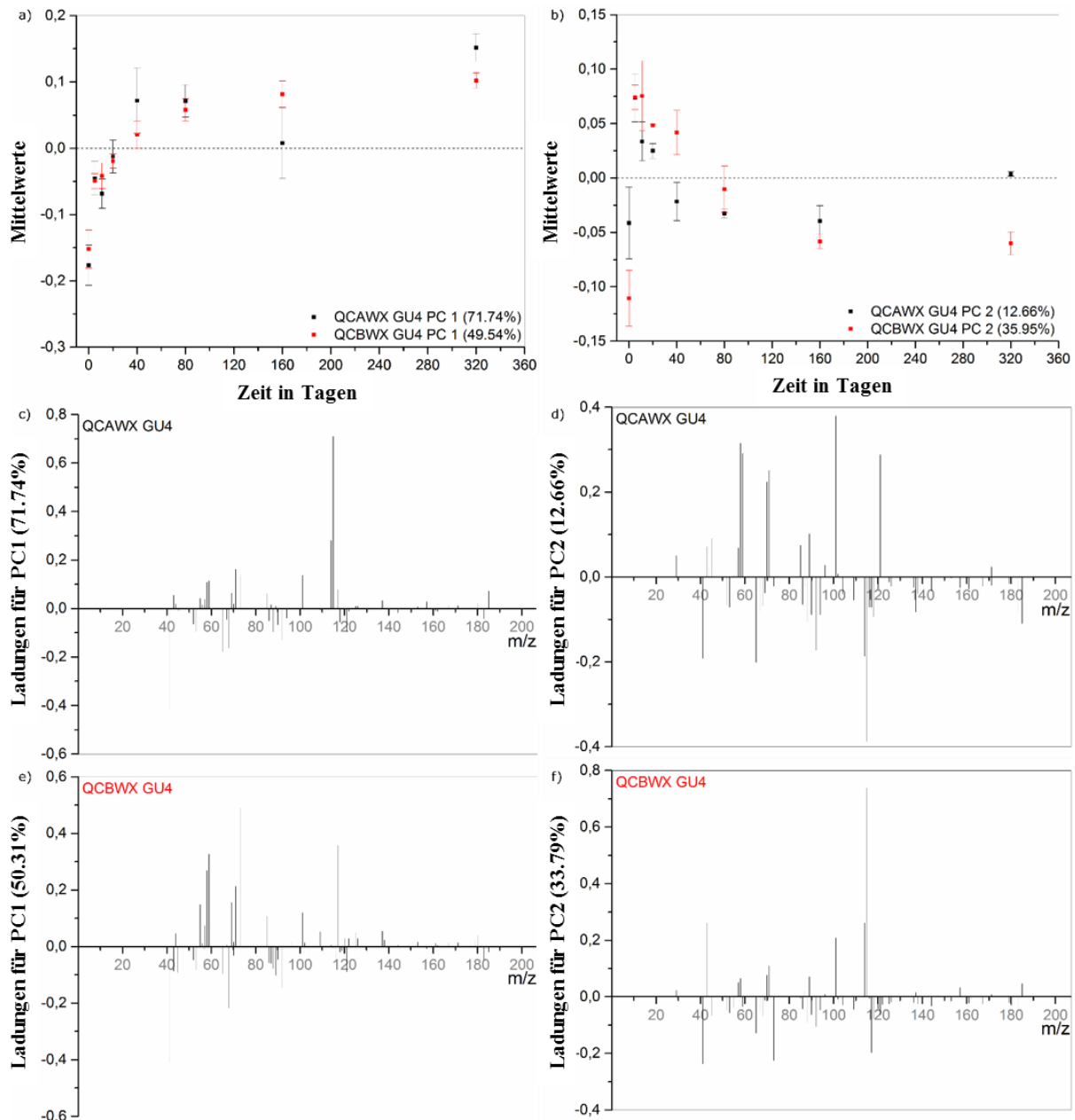


Abbildung 58: ToF-SIMS/PCA Analysen der Glc₄-AB-Spots auf Glasoberflächen nach verschiedenen Lagerungsbedingungen (A = QCAWX GU04 und B = QCBWX GU04) und Lagerungszeiten (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 Tage). Lagerungsbedingung A: im Kühlschrank bei 4°C, B im Exsikkator bei Raumtemperatur; beide Lagerungen unter Laboratmosphäre. Die Punkte in (a) und (b) sind als Durchschnittswerte für wiederholte Analysen mit einem 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken für eine bestimmte Lagerzeit dargestellt (schwarz: Lagerungsbedingung A, rot: Lagerungsbedingung B. Entsprechende Loadings für PC1 werden für Lagerungsbedingung A (c) und B (e) gezeigt und für PC2 für Lagerungsbedingung A (d) und B (f).

Nachdem mit den Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik (XPS, ToF-SIMS) eine Langzeitstabilität der gespotteten Glykan-Oberflächen auf der Glasoberfläche bei beiden Lagerungsvarianten gefunden wurde, wurden in einer parallelen Alterungsstudie Fluoreszenzmessungen durchgeführt, bei denen die Aktivität der gedruckten Glykan Moleküle bezüglich der Interaktion mit dem Lektin Con A-Cy3 nach verschiedenen

Lagerungszeiten getestet wird, also die eigentliche Funktionalität der Glykan Microarrays. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit der Anzahl der direkt zugänglichen Hydroxylgruppen der Glucoseeinheiten und sind somit ein Maß für die Glykan Aktivität.

Die Glykan-Microarrays wurden für die Testreihe im ungewaschenen und gewaschenen Zustand bei den oben beschriebenen Lagerbedingungen A und B gelagert. Für diese Fluoreszenzstudie wurde ein spezielles Design für Microarrays verwendet (Abbildung 59). Die Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen wurden mit jeweils zwei Reihen der Glykanoberflächen Glc₄-AB und Glc₅-AB maschinell bedruckt. Zusätzlich enthält dieses Layout Mannosamin (Man-NH₂) Spots als Positivkontrolle (Anhang 17) und Spots mit der Pufferlösung als Negativkontrollen. Weiterhin wurden β -Amino-Cyclodextrin (CD-NH₂) Spots gedruckt für die keine Bindung zu Con A-Cy3 erwartet wird.

Die Fluoreszenzintensitäten für die Glc₄-AB Oberfläche **13** auf den Glykan-Microarrays sind nach der Interaktion mit Con A-Cy3 nach verschiedenen Lagerungszeiten in Abbildung 60 dargestellt, die Glc₅-AB in Anhang 18.

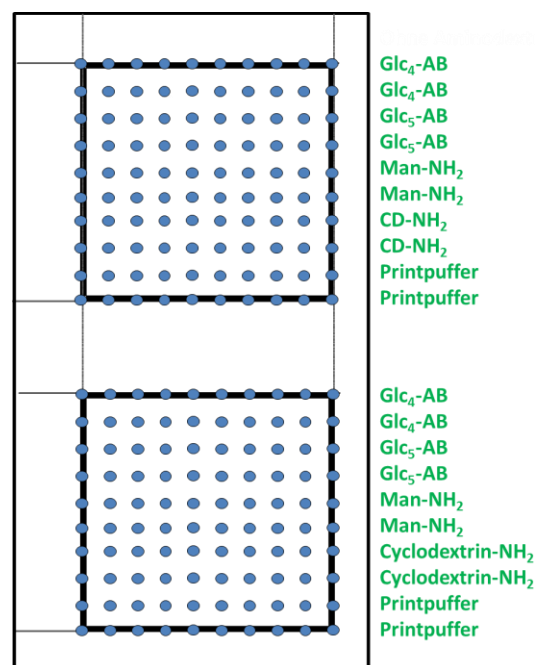


Abbildung 59: Microarray Layout für die Fluoreszenz-basierte Alterungsstudie zur Aktivität der Glykane Glc₄-AB und Glc₅-AB in der Interaktion mit Con A-Cy3. Die Interaktion von Con A-Cy3 mit Mannosamin (Man-NH₂) als Positivkontrolle und β -Amino-Cyclodextrin bzw. Pufferlösung als Negativkontrollen kann ebenfalls getestet werden.

Nach der Inkubation mit Con A-Cy3 stiegen die Fluoreszenzintensitäten in den Glykanspots nach den ersten Tagen der Lagerung (etwa bis Tag 10) bei den Lagerbedingungen A und B in gleicher Weise deutlich an. Nach etwa 20 Tagen Lagerzeit fallen sie wieder auf das zu Beginn der Zeitreihe gemessene Niveau ab. Danach wurden bis zur längsten Lagerzeit (160 Tage) nur geringfügige Änderungen gefunden.

Diese Zunahme der Fluoreszenzintensitäten nach den ersten Tagen ähnelt dem in der ToF-SIMS Alterungsstudie für PC2 beobachteten Verhalten. Es darf in gleicher Weise

spekuliert werden, dass durch die Umlagerung der Glykane ihre Kopplungseffizienz für das Test-Lektin beeinflusst wird.

Die Alterungsstudien zeigten, dass die von Herstellern empfohlene Aufbewahrung von Glykan-Microarrays im Kühlschrank (Lagerungsbedingung A) tatsächlich zu einem Erhalt der Aktivität der immobilisierten Glykanmoleküle über einen vergleichsweise langen Zeitraum von knapp einem halben Jahr führt. In unserer Alterungsstudie ergab sich allerdings kein klarer Vorteil gegenüber der Lagerung bei Raum-Temperatur (Lagerungsbedingung B).

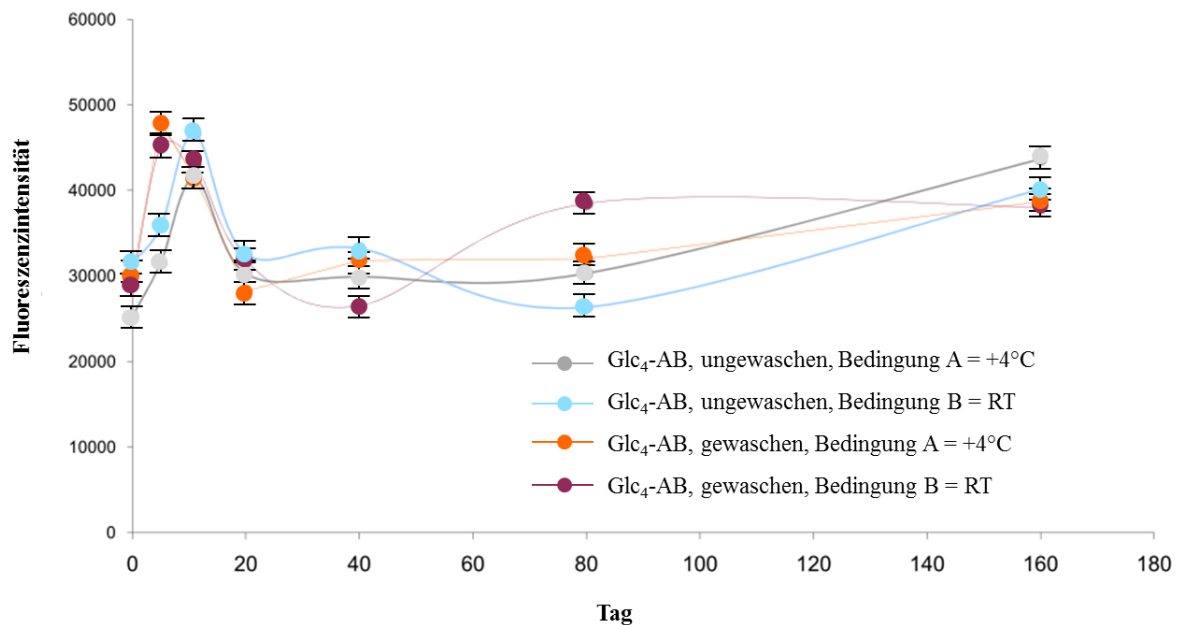


Abbildung 60: Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation der Glykanspots (Glc₄-AB) auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit ConA-Cy3 nach 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 Tagen Lagerung bei 4°C (Bedingung A) und 22°C (Bedingung B) jeweils vor und nach dem Waschen der frischen Glykan-Microarrays.

4.6.5 Zusammenfassung

Das Ziel bestand in der Übertragung der in den vorherigen Kapiteln erarbeiteten Verfahren zur chemischen Charakterisierung und Optimierung der primären Oberflächenfunktionalisierung von Silizium-Wafer und der nachfolgenden Immobilisierung der Glykan-Sonden als wesentliche Schritte in einem Microarrayexperiment auf ein realitätsnahes Microarray-Modell auf einer typischen Glasoberfläche. In diesem Kapitel wird auch auf das in der Microarray-Technik etablierte Charakterisierungsverfahren Fluoreszenz-Mikroskopie zurückgegriffen. Der Einsatz dieses Verfahrens ermöglicht eine Bestimmung der Aktivität von immobilisierten Glykanen in Bezug auf Analytmoleküle die mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Lektinen wie Con A-Cy3 getestet wird.

Der erfolgreiche Verlauf der Ringöffnungsreaktion von Epoxiden durch Amine mit dem Ziel der kovalenten Immobilisierung von Fänger-Glykanen auf GOPTS-funktionalisierten Glasoberflächen wurde durch die Bestimmung der Aminogruppen der Glykane verifiziert. Dabei erwies sich die quantitative XPS als leistungsfähigstes Verfahren.

Die erfolgreiche Immobilisierung der Glykane konnte mit XPS durch Nachweis der Acetalkomponente im hochaufgelösten C1s Spektrum qualitativ nachgewiesen und durch die Bestimmung des Glc₄-AB Stickstoffs im XPS-Übersichtsspektrum quantitativ nachgewiesen werden. Der Nachweis von Glc₄-AB in Spots auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit XPS ist eindeutig und eine Immobilisierungseffizienz von bis zu 77% wurde erhalten.

Nach der Interaktion von Con A-Cy3 mit den gespotteten Glykan-Oberflächen wurde die erfolgreiche Immobilisierung der Glykane auf Epoxidoberflächen, unabhängig über die Messung der Fluoreszenz, eindeutig nachgewiesen.

Die mit Bezug auf eine diagnostische Anwendung der Glykan-Microarrays wichtige Lagerfähigkeit wurde intensiv für unterschiedliche Lagerbedingungen untersucht. Im Ergebnis dieser Studien konnte gezeigt werden, dass eine Lagerzeit von einem knappen halben Jahr erreicht werden kann. Der Nachweis dafür wurde sowohl durch die Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik (XPS, ToF-SIMS) als auch das Fluoreszenzverfahren, in dem die Aktivität der immobilisierten Glykane in einer Interaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Test-Lektin, Con A-Cy3, charakterisiert wird, erbracht.

Die in dieser Arbeit hergestellten Glykan-Microarrays eignen sich grundsätzlich für eine Nutzung als Referenzmaterialien zur Bewertung von Charakterisierungsmethoden, die in der Qualitätssicherung von kommerziellen Glykan-Microarrays bereits zum Einsatz kommen bzw. noch entwickelt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung einer oberflächenanalytischen Methodologie für die Charakterisierung von anwendungsnahen Glykan-Oberflächen wie sie für diagnostische Glykan-Microarrays verwendet werden. Die Aufgabenstellung ergab sich aus dem Projekt BioSurf des Europäischen Metrologieforschungs-Programms (EMRP) dessen Ziel es war, metrologische Grundlagen für eine verbesserte klinische Diagnostik zu liefern. Die Arbeiten wurden in enger Kooperation mit den Projektpartnern, vor allem dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité, Berlin, und einem Berliner Unternehmen (Scienion AG), das im Bereich der Microarray Technologie tätig ist, durchgeführt.

Die durch die Charité neu entwickelten Sonden-Glykane mit Aminolinker wurden mittels Ringöffnungsreaktion der Epoxidgruppen auf Silizium Wafer und Glasoberflächen kovalent fixiert. Die immobilisierten Glykane wurden dann zur Analyt-Bindung benutzt. Mit Hilfe der oberflächenanalytischen Methoden XPS, NEXAFS-Spektroskopie, ToF-SIMS sowie Kontaktwinkelmessungen wurde die erfolgreiche Bindung der Glykane auf den Epoxid-funktionalisierten Silizium- und Glasoberflächen nachgewiesen. Die oberflächenanalytisch erlangten Resultate zeigten, dass mit der gewählten Methodik auch eine erfolgreiche Wechselwirkung zwischen Sonde (Glykan) und Analyt (Ferrocenmolekül, Concanavalin A) einschließlich der Abschätzung von Ausbeuten nachgewiesen werden kann.

Der Aufbau eines Glykan-Microarrays wurde mit der entwickelten Methodik in allen Produktionsstufen bezüglich des Ankers und der Sonde sowie der Wechselwirkung mit dem Analyten untersucht. Vorher wurden die einzelnen Charakterisierungsmethoden mit Hilfe von realitätsnahen Modellschichtsystemen auf Silizium Wafer validiert.

Für die Produktionsstufe „Immobilisierung des Ankermoleküls“ wurde ein auf chemischer Derivatisierung basierender Ansatz für eine Quantifizierung der verfügbaren Epoxidgruppen durch die unabhängigen oberflächenanalytischen Methoden XPS, NEXAFS und Kontaktwinkelmessung entwickelt und validiert. Dazu wurden die Ausbeuten für die zwei verschiedenen benutzten Derivatisierungsreaktionen, die zu quantifizierbaren Fluormarkern führen, mit verschiedenen XPS basierten Verfahren abgeschätzt. Es wurde gezeigt, dass für Epoxidgruppen eine unterschiedliche Reaktivität der Markermoleküle TFAA und TFMBA beobachtet wird, die sich in unterschiedlichen Reaktionsausbeuten widerspiegelt.

Für die Produktionsstufe „Immobilisierung des Sonden-Glykans“ wurden Zucker-Oberflächen, die als Modelle für Glykan-Microarrays dienen, mit oberflächenanalytischen Methoden charakterisiert. Alle untersuchten Sondenmoleküle (Glucosamin, β -Amino-Cyclodextrin, Maltotriose mit Fluorlabel) sind kovalent auf den verwendeten Epoxidoberflächen immobilisierbar. Glucosamin und β -Amino-Cyclodextrin wurde dabei anhand der Stickstoff-Marker mittels XPS nachgewiesen. Die Zucker mit Fluorlabel wurden zusätzlich mit XPS anhand der Fluor-Markergruppe (CF_3) und mittels NEXAFS

Spektroskopie anhand der Aromat-Markergruppe nachgewiesen. Weiterhin wurde ein Wirt-Gast-Komplex aus immobilisiertem Cyclodextrin (CD-NH₂) und Ferrocen als Gast als Modell für Biosensoren untersucht.

Es wurden verschiedene XPS-basierte Quantifizierungsansätze mit dem Ziel der Abschätzung der Effizienz der Immobilisierungsreaktion von Glykanen untersucht. Es wurde gezeigt, dass sich sowohl die Glucosamin Moleküle (Glc-NH₂), die Cyclodextrin Moleküle (CD-NH₂) als auch die synthetisierten Glykane mit Fluorlabel (Glc₃-ATFMP, Glc₃-TFMBA) an die Epoxidgruppen fixieren und quantifizieren lassen. Beim direkten Vergleich der Glykane mit verschiedenen Fluorlabeln, lässt sich feststellen, dass die Glc₃-TFMBA Moleküle eine deutlich höhere Immobilisierungseffizienz aufwiesen als die Glc₃-ATFMP Moleküle.

Die Funktionalität der immobilisierten Glykane, d.h. ihre Fähigkeit Lektine zu binden, wurde ebenfalls an Modellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Concanavalin A erfolgreich mit den Glucoseeinheiten fluorgelabelter Glykan-Oberflächen interagieren. Nachweise dafür wurden mit XP- und NEXAFS-Spektroskopie erbracht, wobei sich der semi-quantitative Nachweis der mit den durch Lektin Con A eingeführten Amidgruppen als fruchtbar erwies. Die Mehrdeutigkeit beim qualitativen Nachweis der Amide mit XPS wurde durch den Einsatz von C-K- und N K-NEXAFS-Spektroskopie aufgehoben. Mit dieser Methode werden Amide eindeutig nachgewiesen. Die für die Glykan-Con A-Oberflächen gewonnenen spektralen Signaturen wurden später als Referenz für die Charakterisierung der Interaktionen des Lektins Con A mit realitätsnahen Glykan-Microarrays auf Glasoberflächen benutzt.

Die mit den Modellschichten erarbeitete Methodologie zur chemischen Charakterisierung und Optimierung der primären Oberflächenfunktionalisierung von Silizium-Wafer und der nachfolgenden Immobilisierung der Glykane wurde erfolgreich auf ein realitätsnahes Microarray-Modell auf einer typischen Glasoberfläche übertragen. Dabei wurde auch auf das in der Microarray-Technik etablierte Charakterisierungsverfahren Fluoreszenz-Mikroskopie zurückgegriffen. Der Einsatz dieses Verfahrens ermöglicht eine Bestimmung der Aktivität von immobilisierten Glykanen in Bezug auf Analytmoleküle, die mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Lektinen wie Con A-Cy3 getestet wurden.

Mit der am Modell entwickelten analytischen Methodik konnte der Nachweis des Glykans Glc₄-AB in Spots auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit XPS eindeutig erfolgen. Eine Immobilisierungseffizienz von bis zu 77% wurde erhalten.

Die mit Bezug auf eine diagnostische Anwendung der Glykan-Microarrays wichtige Lagerfähigkeit wurde für praktisch relevante Lagerbedingungen untersucht. Im Ergebnis dieser Studien konnte gezeigt werden, dass eine Lagerzeit von einem knappen halben Jahr erreicht werden kann. Der Nachweis dafür wurde sowohl durch die Verfahren der chemischen Oberflächenanalytik (XPS, ToF-SIMS) als auch das Fluoreszenzverfahren, in dem die Aktivität der immobilisierten Glykane durch eine Interaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Test-Lektin Con A-Cy3 charakterisiert wird, erbracht.

5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit hergestellten Glykan-Microarrays eignen sich grundsätzlich für eine Nutzung als Referenzmaterialien zur Bewertung von Charakterisierungsmethoden, die in der Qualitätssicherung von kommerziellen Glykan-Microarrays bereits zum Einsatz kommen bzw. noch entwickelt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass die chemische Oberflächenanalytik mit Erfolg zur Optimierung einer Glycan-Microarray Fertigung eingesetzt werden kann. Die entwickelte Methodologie kann zukünftig auch für weitere Microarray-basierte Diagnostikwerkzeuge eingesetzt werden. Sie ist auch ein wertvoller Ansatz für eine Fehleranalyse und kann in Qualitätsmanagementsysteme integriert werden. Dies wird in der nahen Zukunft durch ein Normungsdokument des ISO TC 201 „Surface Chemical Analysis“ unterstützt.

Eine interessante Herausforderung ist es zu versuchen, die entwickelte oberflächenanalytische Methodologie für die Charakterisierung letztlich realer Diagnostikwerkzeuge einzusetzen, z.B. nach Exposition mit Blutserum. Hierbei wird vor allem die unspezifische Adsorption von Proteinen ein wichtiges Thema sein.

6. Experimenteller Teil

6.1 Präparationen der Oberflächen

6.1.1 Referenzproben

Als Substrate für das Aufbringen von Biomolekülen (Glykane bzw. Lektine) wurden Siliziumwafer (1.5 cm x 2 cm große Stücke) verwendet. Alle Siliziumoberflächen wurden in Isopropanol (3 x) und Ethanol (1x) gereinigt.

6.1.1.1 Rotationsbeschichtung der Siliziumoberfläche mit β -Amino-Cyclodextrin (CD)

500 μ l einer 3 % v/v β -Amino-Cyclodextrin-Lösung in millipore Wasser wurde mittels Rotationsbeschichtung (CONVAC TSR 110, spin coating, 3000 rpm für 20 Sekunden) auf die Siliziumoberfläche aufgetragen. Anschließend wurde die CD-beschichtete Oberfläche getrocknet. Die Lagerung der Referenzprobe erfolgte in Stickstoffatmosphäre im lichtdichten Behältnis.

6.1.1.2 Beschichtung der Siliziumoberflächen mit Glykanen

Die frisch hergestellten Glykane (Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA) wurden in millipore Wasser gelöst und auf die Siliziumoberflächen aufgetragen (20 μ l Tropfen). Nachdem der Tropfen eingetrocknet ist, wurden diese Referenzproben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

6.1.1.3 Beschichtung der Siliziumoberfläche mit Concanavalin A

0.2 mg Concanavalin A wurden in 1ml TRIS-HCl (10 mM, pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂) gelöst und auf die Siliziumoberfläche aufgetragen (20 μ l Tropfen). Nachdem der Tropfen eingetrocknet ist, wurde die Con A Referenzprobe bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

6.1.2 Oberflächenmodifizierungen

6.1.2.1 Oberflächenfunktionalisierung mit 3-(Glycidoxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS)^[174]

Vor der eigentlichen Funktionalisierung mit Epoxidgruppen wurden die Silizium- und Glasoberflächen vorbehandelt, um die Verunreinigungen von der Oberfläche zu entfernen, da diese die Zugänglichkeit der Silanolgruppen beeinträchtigen können, und um die Anzahl der Hydroxygruppen auf der Substratoberfläche zu maximieren. Die Reinigung der Glasoberflächen wurde mit einer 10%igen Deconex 11 universal Lösung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine alkalische Reinigungslösung für Laborwaren mit folgenden Inhaltsstoffen: Alkalispender, oberflächenaktive Stoffe und anorganische Chlorträger. Bei der

Waschprozedur wurden die Glasoberflächen bei 60°C in 10%ige Deconex 11 Lösung getaucht und 20 min lang im Ultraschallbad behandelt. Nach der Reinigung wurden die Glasoberflächen 6 x mit millipore Wasser gewaschen.

Die Siliziumoberflächen mussten vor der Silanisierung außerdem noch aktiviert werden. Zur Entfernung des Schutzfilmes der Siliziumoberflächen wurden die Oberflächen zunächst in Isopropanol getaucht und für 10 min in das Ultraschallbad gegeben. Zur Aktivierung wurden die Oberflächen für 10 Minuten mittels UV-Ozon Photoreaktor (PR-100) behandelt.

Da die Silane mit Wasser unter Bildung von Polykondensationsprodukten reagieren, wurde das Reaktionsgefäß kurz vor der Silanisierungsreaktion für 10 min bei 80 °C vorgewärmt, um das Restwasser zu entfernen. Anschließend wurden die gereinigten Silizium- und Glasoberflächen bei 80°C für drei Stunden in die Reaktionslösung (23 mM GOPTS in Toluol) getaucht. Anschließend wurden die Oberflächen durch Waschen mit Toluol (1x) mit Methanol (3x) und Aceton (2x) für jeweils 10 min von überschüssigem GOPTS befreit. Im Laufe der Waschprozedur musste darauf geachtet werden, dass während des Wechsels der Waschlösung die Oberfläche der Substrate nicht trocknet. Im Falle der Eintrocknung würden sich die Aggregate zu fest auf der Oberfläche absetzen und sich im ungünstigsten Fall dann nicht mehr entfernen lassen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Silizium- und Glasoberflächen in einem Trockengefäß in Argonatmosphäre getrocknet.

6.1.2.2 Derivatisierung von GOPTS-funktionalisierten Oberflächen

Derivatisierung mit TFAA in der Gasphase^[269]

Die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen wurden in einer speziellen Apparatur^[180] für die Gasphasen-Derivatisierung mit TFAA nach folgender Vorschrift behandelt. Das Substrat wurde in die Vakuumkammer der Apparatur gelegt und diese 5 min evakuiert (< 10 mbar). Danach wurde die Apparatur sofort mit Stickstoff befüllt. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Ventil zum Stickstoff geschlossen und 5 min evakuiert (< 10 mbar). Danach wurde ein Reservoir mit 1 ml TFAA an die Apparatur angeschlossen. Im Anschluss wurde das Ventil zur Pumpe geschlossen und sofort danach das Ventil zum TFAA-Reagenzglas geöffnet, so dass das TFAA in die Derivatisierungsapparatur hinein verdampfen kann. Die Probe wurde 30 min in der TFAA-Atmosphäre belassen. Nach dieser Zeit wurde wiederum 30 min abgepumpt und im Anschluss wurde die Apparatur mit Stickstoff befüllt sowie die Probe entnommen. Kurz danach wurden die XPS-Messungen durchgeführt.

Derivatisierung mit TFMBA in der Flüssigphase

Die Umsetzung der Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen erfolgte mit einer 300 mM TFMBA Lösung in Natriumcarbonatpuffer Na₂CO₃ (pH 9.5). Die Oberflächen wurden bei Raumtemperatur für 24 Stunden in einer Feuchtekammer inkubiert. Dazu wurde die Lösung direkt auf die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen getropft. Danach wurden die Oberflächen 6 x gründlich mit millipore Wasser für jeweils 10 min gewaschen. Kurz danach wurden die XPS-Messungen durchgeführt.

6.1.2.3 Synthesen von Glykanen mit Fluorlabel bzw. Fluoreszenzlabel

Die Aldehydfunktion der Maltotriose reagiert mit ATFMP bzw. TFMBA zur Schiff'schen Base (Azomethin, Imin). Das Natriumcyanoborhydrid reduziert die Schiff'sche Base zu einem sekundären Amin^[252-257].

Die selektive Bindung von Fluoratomen in Naturstoffe kann spezifische Veränderungen der Moleküleigenschaften bewirken. Üblich ist dabei der Austausch eines Wasserstoffatoms oder einer Hydroxylgruppe. Fluor und Wasserstoff haben ähnliche Van-der-Waals- Radien, demgegenüber unterscheiden sie sich aber dramatisch in der Polarisierung ihrer Bindung zum Kohlenstoff. Kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, so kann die Hydroxylgruppe sowohl als Donor als auch Akzeptor sein. Das Fluoratom hingegen kann nur als Akzeptor fungieren. Bei der Substitution einzelner Hydroxylgruppen in Monosacchariden resultiert aus der stärkeren Elektronegativität des Fluors eine erhöhte Acidität benachbarter Hydroxylgruppen. Im Falle von Glycosylfluoriden verhindert das Fluoratom auch noch die Ringöffnung und damit die Ausbildung konformativer Gleichgewichte in Lösung.^[258, 259, 260]

Die speziellen Modifikationen mit Fluor an Glykanen können unter Umständen zu einer Veränderung ihrer biologischen Aktivität führen. Aus diesem Grund werden die hier verwendeten Glykane mit Fluorlabel ausschließlich als Modelle für die Immobilisierung auf Epoxidoberflächen genutzt.

Synthese von Glykanen (Oligoglucose Moleküle) mit ATFMP-Label bzw. TFMBA-Label

Es wurden 5 mg von ATFMP bzw. TFMBA abgewogen und in Essigsäure/DMSO-Gemisch (3:7) gelöst. Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3), ein starkes Reduktionsmittel, im Verhältnis 5:6 hinzugegeben. Das Markierungsreagenz (20 μL) wurde zur Maltotriose (1 mg/ml) hinzugegeben und dieses Reaktionsgemisch wurde im Dunkeln inkubiert (2 h, 65 °C, 300 rpm). Die Abtrennung von überschüssigen ATFMP bzw. TFMBA-Reagenz erfolgte über die Säulenchromatographie. Reinheit und Zusammensetzung der Glykane wurde mittels MALDI-TOF-MS bestätigt.

Synthese von Dextranhydrolysat gelabelt mit 2-Aminobenzamid

Es wurden 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ von 2-Aminobenzamid abgewogen und in Essigsäure/DMSO-Gemisch (3:7) gelöst. Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3), ein starkes Reduktionsmittel, im Verhältnis 5:6 hinzugegeben. Das Markierungsreagenz (10 μL) wurde zum Dextranhydrolysat (1 mg/ml) hinzugegeben und dieses Reaktionsgemisch wurde im Dunkeln inkubiert (2 h, 65 °C, 300 rpm). Die Abtrennung von überschüssigen 2-AB-Reagenz erfolgte mittels Säulenchromatographie. Die gelabelten Glucoseeinheiten (Glucose 4 bis 7) wurden anschließend mittels HPLC fraktioniert. Reinheit und Zusammensetzung der Glykane wurde mittels MALDI-TOF-MS bestätigt.

6.1.2.4 Präparation von Modell-Glykan-Oberflächen auf natürlich oxidierten Siliziumoberflächen

Präparation von Glucosamine Hydrochlorid (Glc-NH₂*HCl) Oberflächen

Die Umsetzung der Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen erfolgte mit einer 300 mM Glc-NH₂*HCl Lösung in Natriumcarbonatpuffer (Na₂CO₃) bei einem pH-Wert von 9.5. Die Oberflächen wurden bei Raumtemperatur für 24 Stunden in einer Feuchtkammer inkubiert. Dazu wurde die Lösung direkt auf die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen getropft. Danach wurden die Oberflächen 6 x gründlich mit millipore Wasser für jeweils 10 min gewaschen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Proben bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

Präparation von β -Amino-Cyclodextrin Oberflächen

Die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen wurden mit einer 300 mM β -Amino-Cyclodextrin Lösung in Natriumcarbonatpuffer (Na₂CO₃) bei einem pH-Wert von 9.5 für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Dazu wurde die Lösung direkt auf die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen getropft. Nicht gebundene β -Amino-Cyclodextrin Moleküle wurden anschließend durch gründliches Waschen mit millipore Wasser (t=3h) entfernt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Proben bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

Präparation von β -Amino-Cyclodextrin-TFMBA Oberflächen

Die β -Amino-Cyclodextrin-Oberflächen wurden mit einer wässrigen TFMBA-Lösung behandelt. Die Inkubation erfolgt nach dem Derivatisierungsprotokoll mit TFMBA in Na₂CO₃ pH 9.5 (s.a. Abschnitt 6.1.2.2). Anschließend wurden die Proben 6 x mit millipore Wasser für jeweils 10 min gewaschen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Proben bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

Präparation von β -Amino-Cyclodextrin-Ferrocen Oberflächen

Die β -Amino-Cyclodextrin-Oberflächen wurden mit einer 2 mM Ferrocen Lösung (Toluol) für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Nicht gebundenes Ferrocen wurde anschließend durch gründliches Waschen mit Toluol (4x für je 10 Minuten) entfernt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Proben bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

Präparation von Glc₃-ATFMP und Glc₃-TFMBA Oberflächen

Die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen wurden mit einer 50 mM Glc₃-ATFMP bzw. Glc₃-TFMBA Lösung (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.5) für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Dazu wurde die Lösung direkt auf die Epoxid-funktionalisierten Siliziumoberflächen getropft. Nicht gebundene Glykane wurden

anschließend durch gründliches Waschen mit millipore Wasser ($t=2h$) entfernt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Proben bei 4°C in Stickstoffatmosphäre gelagert.

6.1.2.5 Präparation von Glykan-Microarrays

Präparation von Glc₄-2AB bzw. Glc₅-2AB Microarrays

Die Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen wurden mit einer 0.5 mM Glc₄-2AB bzw. Glc₅-2AB Lösung (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.5) bedruckt. Das Drucken der Glykan-Microarrays erfolgte mittels sci FLEXARRAYER S11 (Scienion AG, Berlin) bei 19°C in einer Kammer bei 60%iger Luftfeuchtigkeit. Die gedruckten Microarrays wurden anschließend für 46 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer (60% relative Luftfeuchtigkeit) gelagert. Nicht gebundene Glykane wurden anschließend durch gründliches Waschen mit Natriumphosphatpuffer (3x je 5 Minuten) entfernt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Glykan-Microarrays bei 4°C in Argonatmosphäre gelagert.

6.1.2.6 Layouts für Glykan-Microarrays

Array Layout 1 für XPS- und ToF-SIMS-Messungen:

- Durchmesser (Spot) = 250 μm
- Spot zu Spot Abstand = 300 μm
- 8 Arrays pro Glasoberfläche
- Glc₄-2AB, Glc₅-2AB, β -CD-NH₂, NaPP enthalten je 3 x 5 Spots
- 4 Tropfen pro Spot
- V (Spot) = 1500 nl

Für die XPS Messungen wurde ein spezielles Layout gewählt: 15 identische Spots, die eine Fläche von $\sim 800 \times 1350 \mu m^2$ abdecken. Die XPS-Analyse wurde in einer Fläche von $300 \times 700 \mu m^2$ durchgeführt (field of view). Die maximale Erreichbarkeit der Spots ist während der XPS Messungen in dieser Fläche (field of view) gewährleistet und gleichzeitig kann der Beitrag der Epoxidoberfläche minimiert werden. Diese Einstellung ermöglicht den empfindlichsten Spektroskopiemodus des Instruments bei einem minimalen Risiko von Strahlenschäden.

Array Layout 2 für Fluoreszenzmessungen:

- Durchmesser (Spot) = 230 μm
- Spot zu Spot Abstand = 500 μm
- 2 Arrays pro Glasoberfläche
- Glc₄-2AB, Glc₅-2AB, β -CD-NH₂, NaPP enthalten je 2 Reihen
- 3 Tropfen pro Spot
- V (Spot) = 1100 nl

6.1.2.7 Präparation von (Modell)-Glykan-Con A Oberflächen

Die hier beschriebene Methode dient zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Glykanen und Concanavalin A (Con A), hier Glucosederivate und Con A. Für die Con A Inkubation wurden zunächst die verbliebenen freien Epoxidgruppen auf dem Substrat, die nicht mit Glykanen umgesetzt wurden, mit einer Lösung von 100 mM Ethanolamin in Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 8.5) für eine Stunde bei 50°C deaktiviert. Anschließend wurden die Oberflächen mehrfach (3x) mit Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 8.5) gewaschen. Danach erfolgte die Con A Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einer Lösung von 0.2mg/ml Con A bzw. ConA-Cy3 in 10 mM TRIS-HCl (pH 7.4, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2). Zur weitgehenden Entfernung adsorptiv gebundener Lektine (Con A) wurden die Oberflächen zweimal gründlich mit PBS-T (pH 7.4, enthält 0.05% Tween 20) und dreimal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Modell-Glykan-Con A Oberflächen in Argonatmosphäre getrocknet. Die Glykan-Con A Microarrays wurden mittels Zentrifugation getrocknet und anschließend bei 4°C in Argonatmosphäre gelagert.

6.2 Instrumentelle Analytik

6.2.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

Die Labor-XPS-Messungen wurden mit einem Spektrometer der Firma Kratos vom Typ AXIS Ultra DLD (Kratos Ltd., Manchester, UK) durchgeführt. Zur Anregung der Elektronen wurde monochromatisierte Al $K\alpha$ (1486,6 eV) Strahlung verwendet^[261]. Die Passenergie betrug 80 eV für Übersichtsspektren und 20 eV für hochaufgelöste C1s, N1s, F1s und O1s Spektren. Die Beschleunigungsspannung an der Röntgenanode wurde auf 15 kV und die Stromstärke der Emission auf 20 mA eingestellt. Die Energieskala des Analysators wurde nach einem Verfahren von Kratos kalibriert, die standardisierte Bindungsenergie Daten nutzt (ISO 15472)^[262]. Der Analysenbereich betrug 300x700 μm^2 . Der Winkel α zwischen Röntgenquelle und Eintrittsspalt des Elektronenanalysators betrug 60° oder 0°.

XPS-Messungen wurden auch an der HE-SGM-Beamline des Speicherrings BESSY II mit einem Scienta 3000 Spektrometer durchgeführt (Berlin, D). Die Spektren wurden im FAT-Modus (Fixed Analyser Transmission) mit folgenden Anregungsenergien gemessen: F1s 780 eV, O1s 620 eV, N1s 500 eV und C1s 385 eV jeweils mit einer Passenergie von 50 eV.

Die XPS-Übersichtsspektren und Detailspektren der Siliziumoberflächen wurden unter einem Emissionswinkel von 60° gemessen. Zur Reduzierung der Substrat-Signale wurde dieser Emissionswinkel gewählt, da so eine höhere Oberflächensensitivität erreicht wird.

Die Messdaten wurden in VAMAS-Dateien umgewandelt und in das Auswertungsprogramm CasaXPS (Version 2.3.16) übertragen. Es wurde eine lineare Basislinienkorrektur durchgeführt. Als Referenzsignal für die Korrektur der Spektren diente die C1s-Photolinie des aliphatischen Kohlenstoffs, dessen Bindungsenergie auf 285.0 eV festgelegt wurde^[263-264]. Die mit der Kurvenanpassung ermittelten Werte für die Bindungsenergien, die Halbwertsbreiten und die Flächen der Komponentenkurven unterliegen einem Fehler, der aus dem mathematischen Verfahren der Kurvenanpassung hervorgeht. Die Fehler wurden dabei nach dem Matrixinversionsverfahren berechnet^[265]. Für alle XPS Übersichtsspektren sowie

den hochaufgelösten Detailspektren lag der Fehler bei ca. 1-5 %. Die Darstellung der Spektren erfolgte mit *Origin 9.0 G*.

6.2.2 Kantennahe-Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (NEXAFS)

Es wurden NEXAFS-Messungen an der HE-SGM-Beamline bei BESSY II durchgeführt. Zur Detektion der emittierten Sekundär-Elektronen wurde ein Channelplate-Detektor (2.1 – 2.3 kV) benutzt. Alle Röntgenabsorptionsspektren an der K-Kante der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff sind im PEY-Modus (Partial Electron Yield) mit einer retardierenden Spannung von -150 eV aufgenommen worden^[234]. Die Energieauflösung $E/\Delta E$ des Monochromators an der π^* -Resonanz von CO bei 287.4 eV wurde mit ~2500 bestimmt. Die gemessenen Spektren wurden mit der Transmissionsfunktion korrigiert, welche mit einem frisch gesputterten Au-Substrat aufgenommen wurde. Alle hier vorgestellten Messungen wurden beim magischen Winkel (55°-Winkel) zwischen der Substratoberfläche und dem Richtungsvektor des eingestrahnten linear polarisierten Lichtes durchgeführt. Auf Basis der $C1s \rightarrow \pi^*$ -Resonanz bei 285,4 eV^[266] gemessen an einer Graphitoberfläche (Highly Ordered Pyrolytic Graphite (HOPG); Advanced Ceramic Corp., Cleveland, USA) erfolgte die Kalibrierung der Energieachse. Die Darstellung der Spektren erfolgte mit Origin 9.0 G. Alle Spektren wurden nach Stöhr^[234] in Einheiten des Kantensprungs normiert.

6.2.3 Flugzeit-Sekundärionen-Massen-Spektrometrie (ToF-SIMS)

Als Messgerät kam ein Flugzeitmassenspektrometer TOF-SIMS IV der Firma ION-TOF GmbH (Münster, D) zum Einsatz. Die Abmessungen des analysierten Bereiches entsprachen etwa einem Quadrat von 200 x 200 μm^2 . Die Proben wurden mit Bi_3^+ -Primärionen (Energie=25 keV) beschossen. Gemessen wurde unter statischen SIMS-Bedingungen. Die Positivionen-Massenspektren wurden auf die Masse der Sekundärionensignale von $C_2H_5^+$, $C_3H_7^+$ und $C_4H_9^+$ kalibriert. Die Negativionen-Massenspektren wurden auf die Sekundärionensignale von SiO^- , SiO_2^- , SiO_3^- , $Si_2O_5^-$, $Si_3O_7H^-$, $Si_4O_9H^-$ kalibriert. Die Messdaten wurden mittels SurfaceLab 6 (ION-TOF) ausgewertet.

6.2.4 Kontaktwinkelmessungen

Statische Kontaktwinkelmessungen nach der *Sessile Drop*-Methode wurden an einem Kontaktwinkelmessgerät DSA25 der Firma KRÜSS durchgeführt. Als Messmedium diente millipore Wasser. Angegeben wurde jeweils der Mittelwert aus 6 Messungen pro Probe, der statistische Messfehler lag bei $\pm 1^\circ$ - 2° . Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Tropfenvolumen von 2 μl durchgeführt.

6.2.5 Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem Fluoreszenzscanner der Firma Tecan LS (USA). Dazu wurde eine Wellenlänge von 532 nm zur Anregung eingestellt und mit einer Laserstärke von 100% und einer Pixelauflösung von 10 μm im Einzel- oder Multiimage

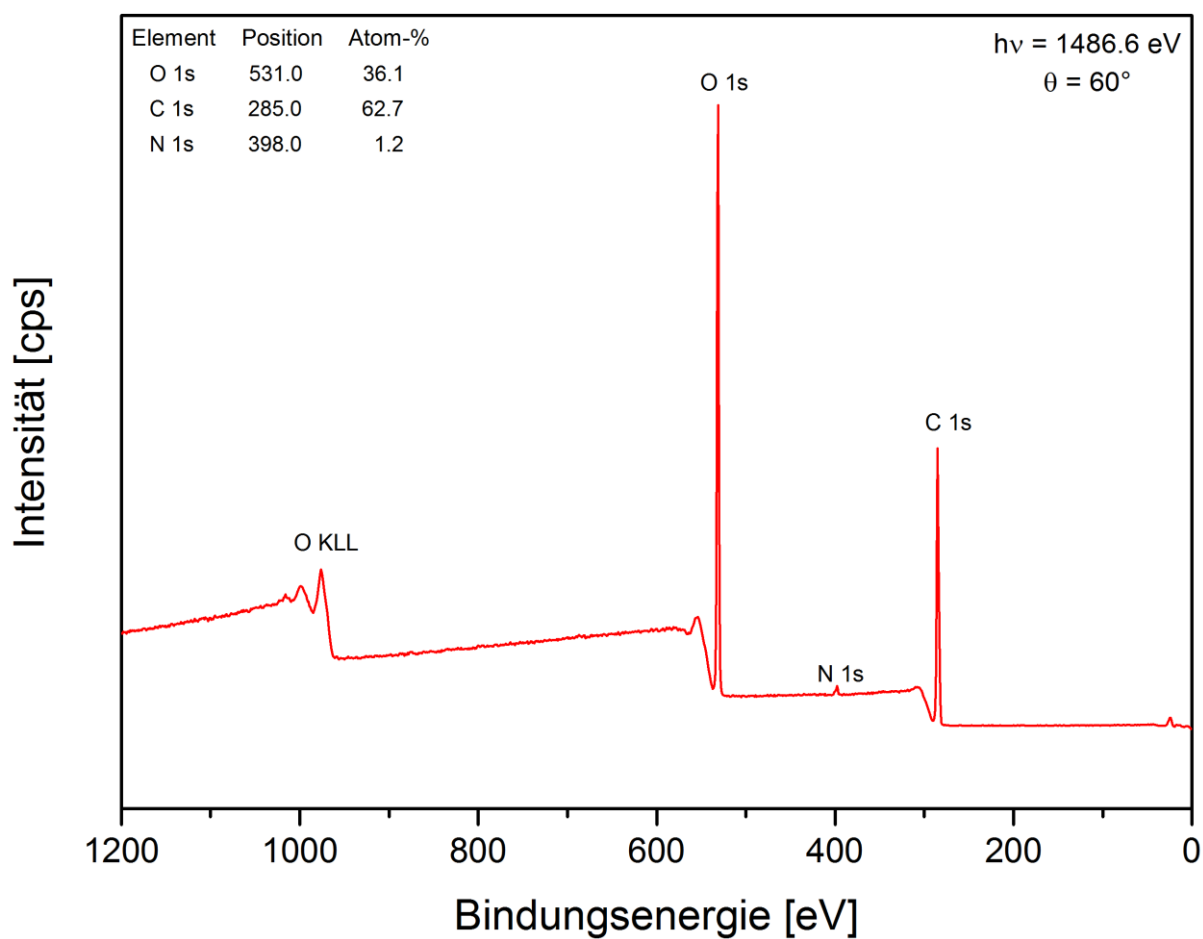
Modus gearbeitet. Die Fluoreszenzdaten wurden mit dem Auswertungsprogramm GenePix 5.1 dargestellt.

6.2.6 MALDI-TOF-MS

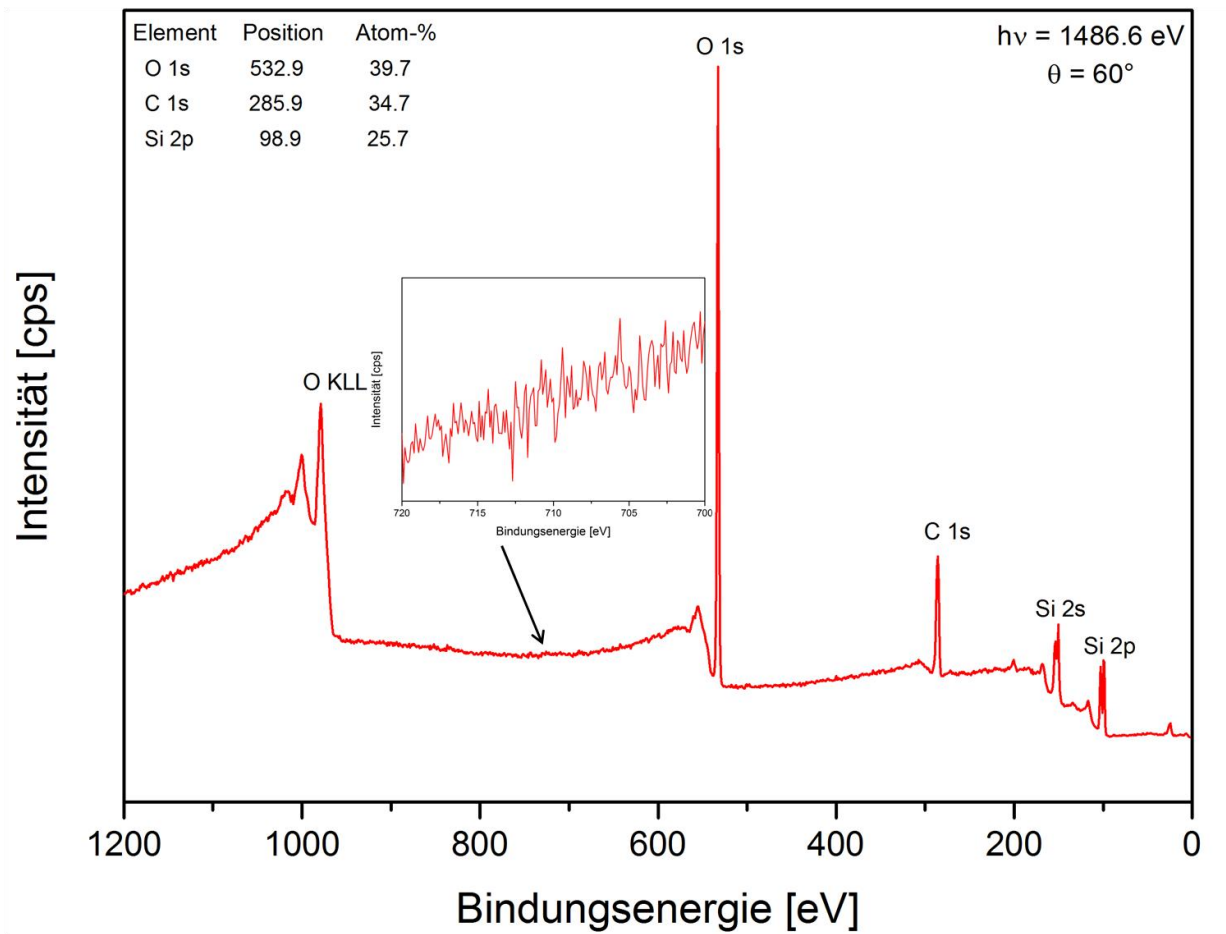
Die MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) erfolgte mit einem Ultraflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Für die Messung von Glykanen mit Fluorlabel bzw. Fluoreszenzlabel wurde super 2,5-Dihydroxybenzoesäure (sDHB) als Matrix verwendet. DHB wurde in einer Endkonzentration von 10 mg/mL in 10% Acetonitril gelöst und 0.5 µL davon mit 0.5 µL Probe auf einem MALDI-Stahltarget gemischt und getrocknet (Dried-Droplet-Methode). Die Glykane reicherten sich beim Auskristallisieren im äußeren Bereich des Spots an (aktive Kristalle). Bei der Vermessung von Glykanen mit Fluorlabel bzw. Fluoreszenzlabel im Positivionenmodus erfolgte die Kalibrierung des Geräts mit dem Kalibrierstandard Dextranhydrolysat (0.15 µg/µl). Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit FlexAnalysis, GlycoWorkbench^[267] und GlycoPeakfinder^[268].

7. Anhang

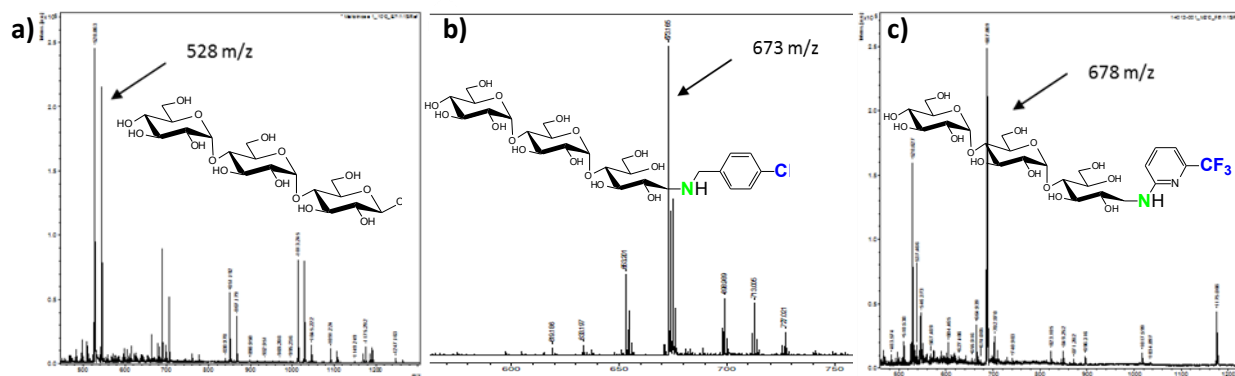
XPS-, ToF-SIMS-, MALDI-TOF-MS- und Fluoreszenzspektren



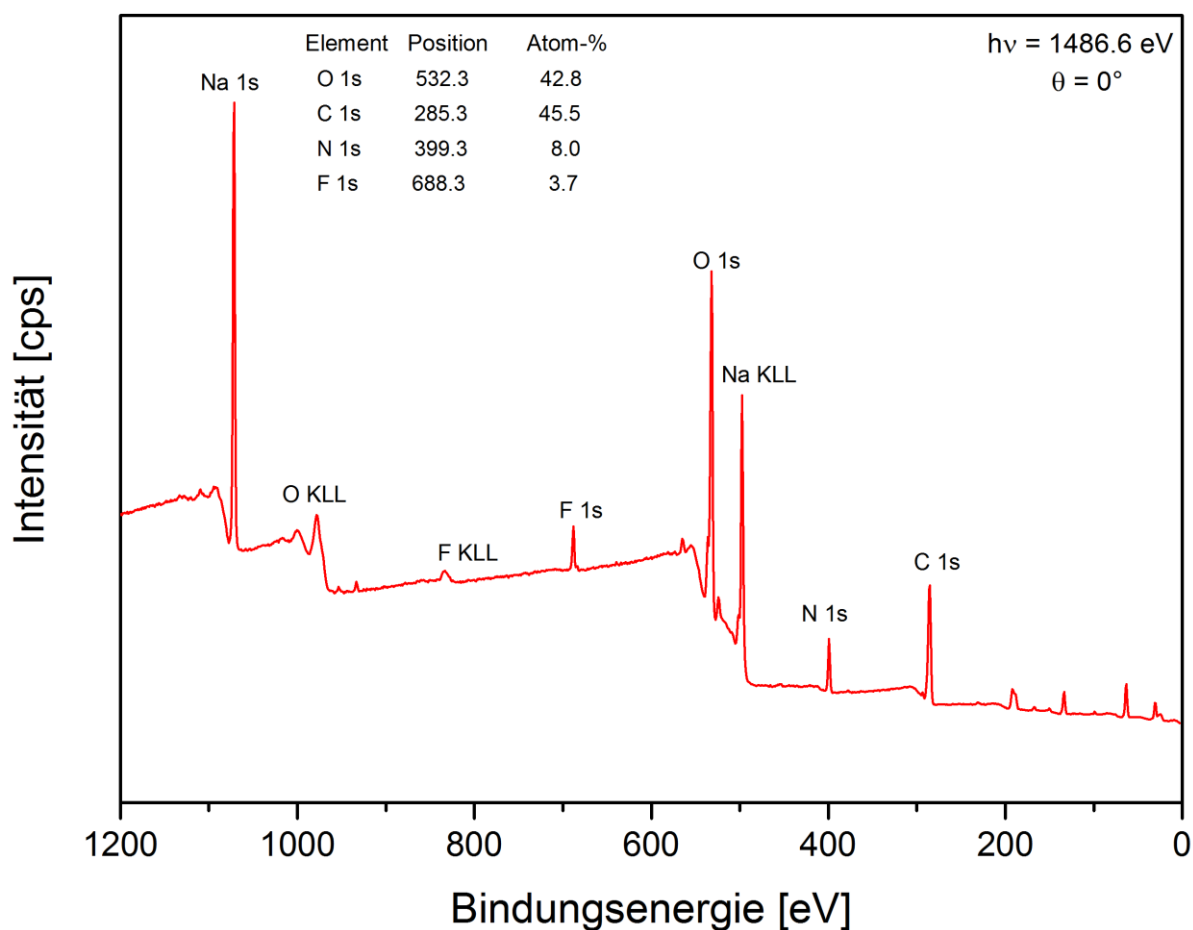
Anhang 1: XPS Übersichtsspektrum einer Amino-Cyclodextrin-Referenzprobe, spin coated auf Silizium (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).



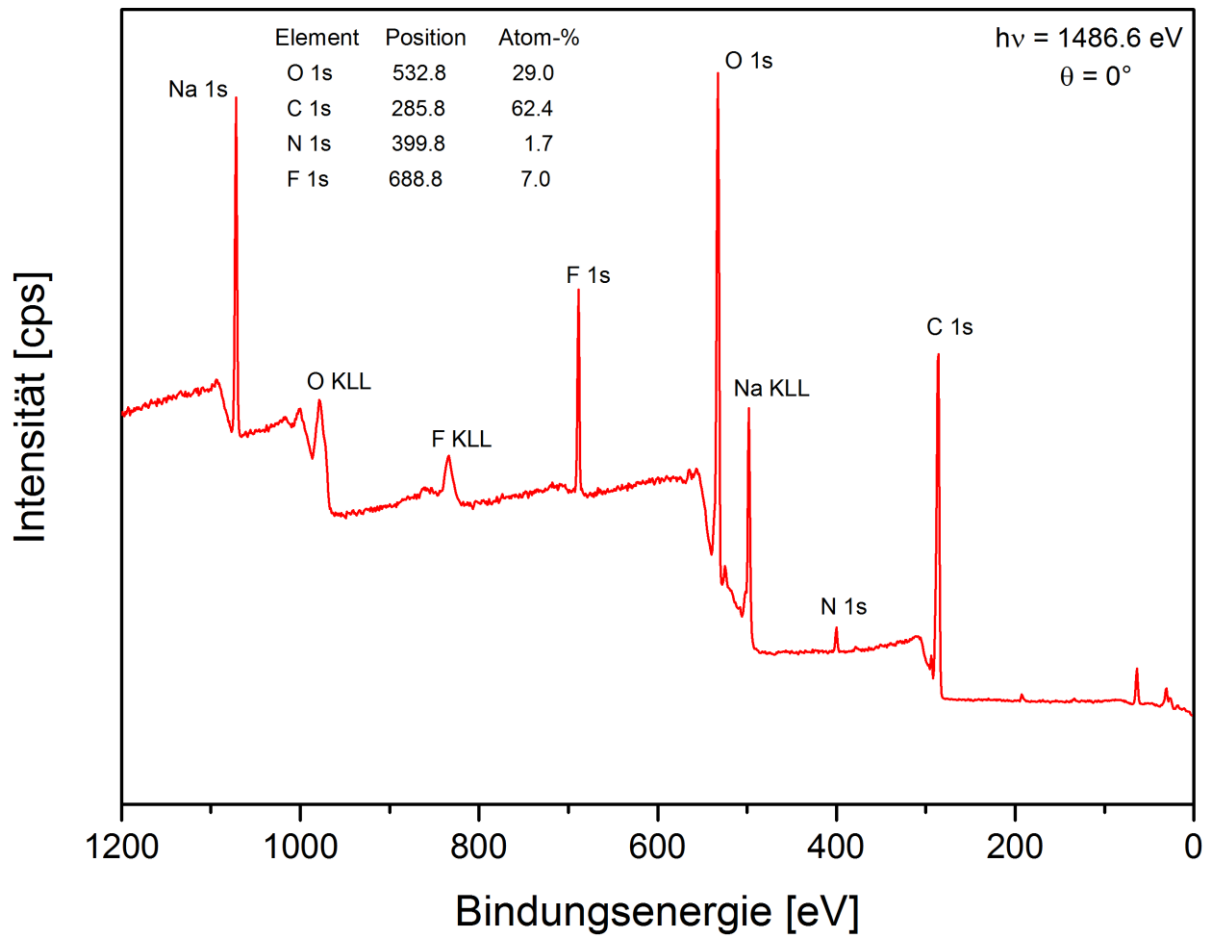
Anhang 2: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes XPS Fe2p-Spektrum zur Untersuchung der Interaktion von Ferrocenmolekülen mit Epoxid-funktionalisierten Silizium-Oberflächen als Kontrollexperiment (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 5.7 nm).



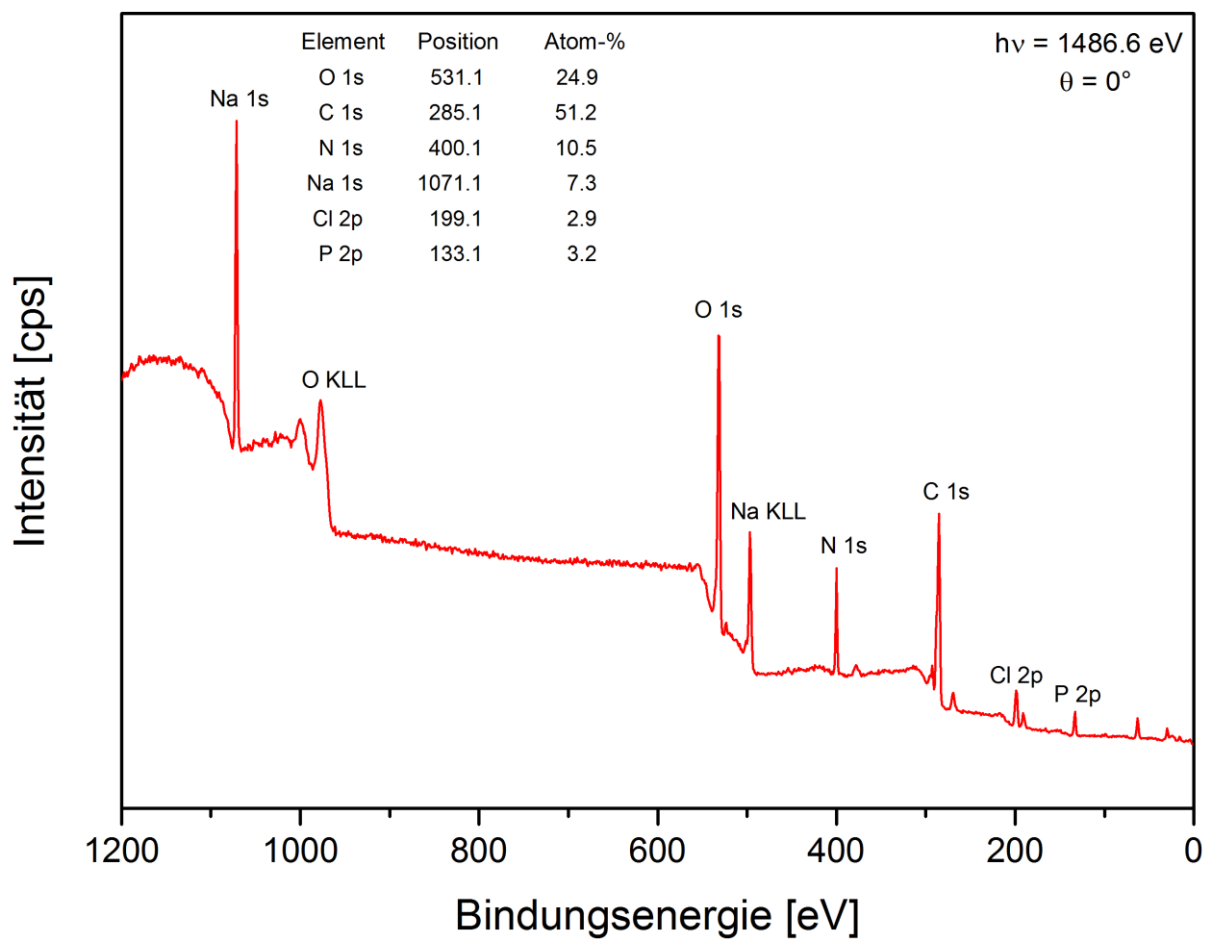
Anhang 3: MALDI-TOF-MS von Maltotriose (a), Maltotriose mit ATFMP-Label (b) und Maltotriose mit TFMBA-Label (c)



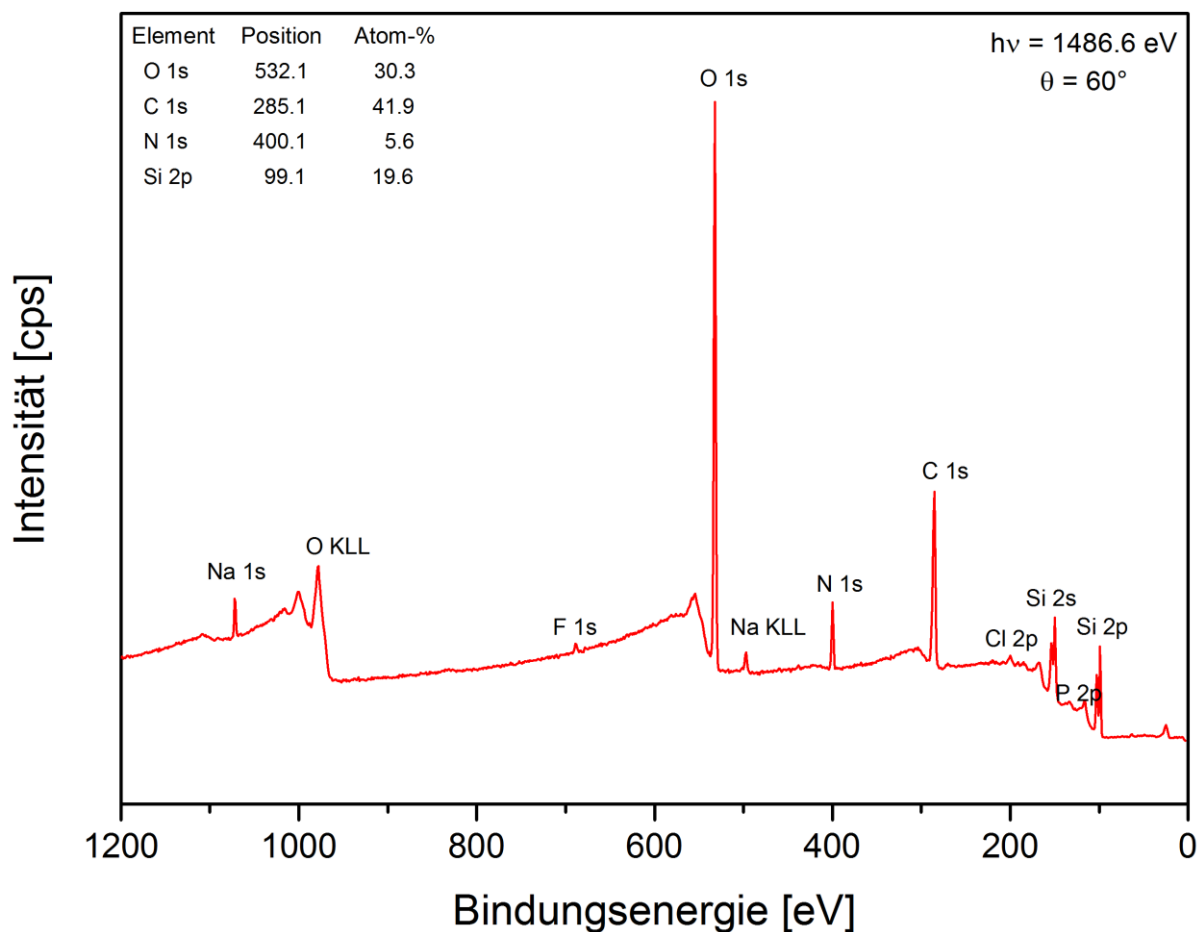
Anhang 4: XPS Übersichtsspektrum einer Maltotriose mit ATFMP-Label als Referenzprobe aufgetropft auf Silizium (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von $\sim 10 \text{ nm}$).



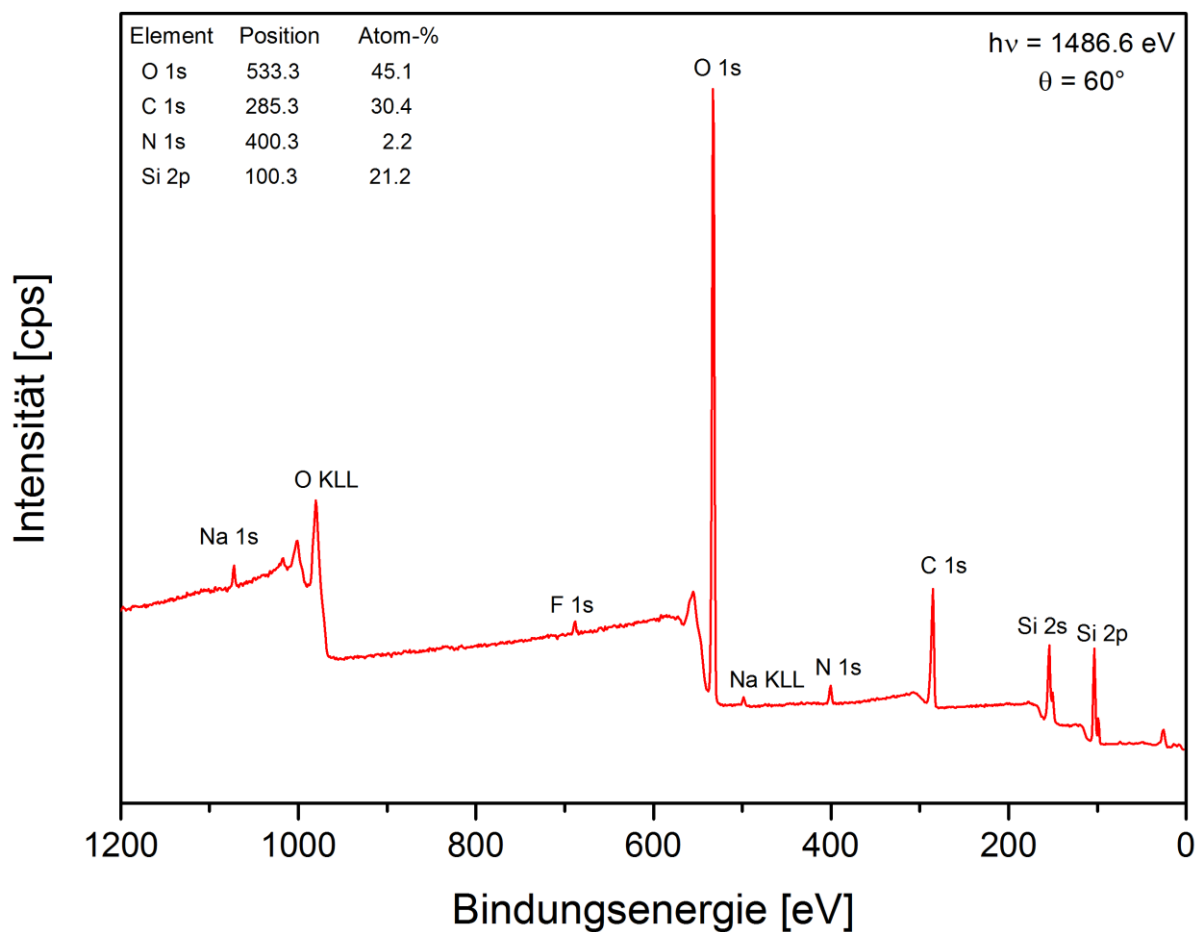
Anhang 5: XPS Übersichtsspektrum einer Maltotriose mit TFMBA-Label als Referenzprobe aufgetropft auf Silizium (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).



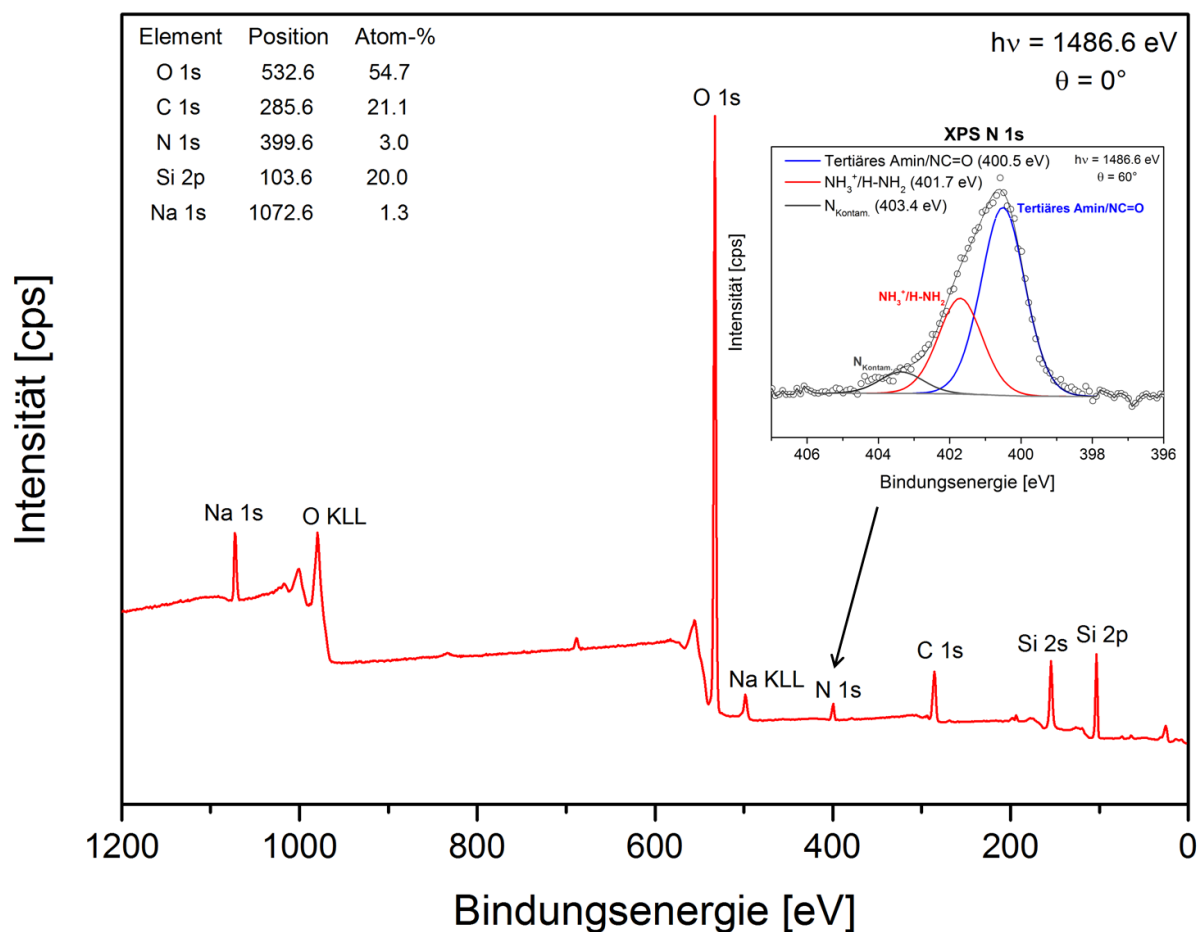
Anhang 6: XPS Übersichtsspektrum der Con A Referenzprobe aufgetropft auf Silizium ($Al K\alpha$, $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von $\sim 10 \text{ nm}$).



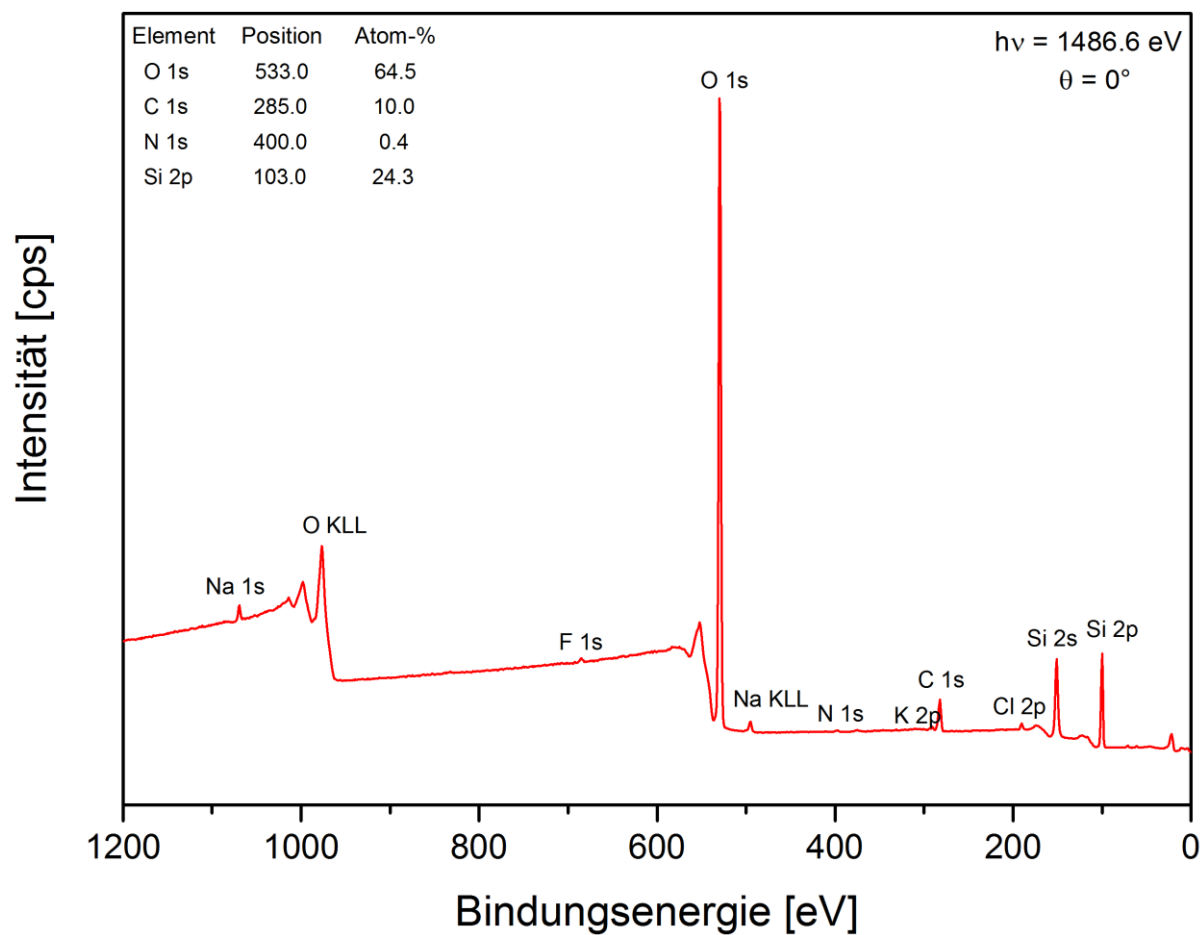
Anhang 7: XPS Übersichtsspektrum von Concanavalin A auf einer Epoxidoberfläche, (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 5.7 nm).



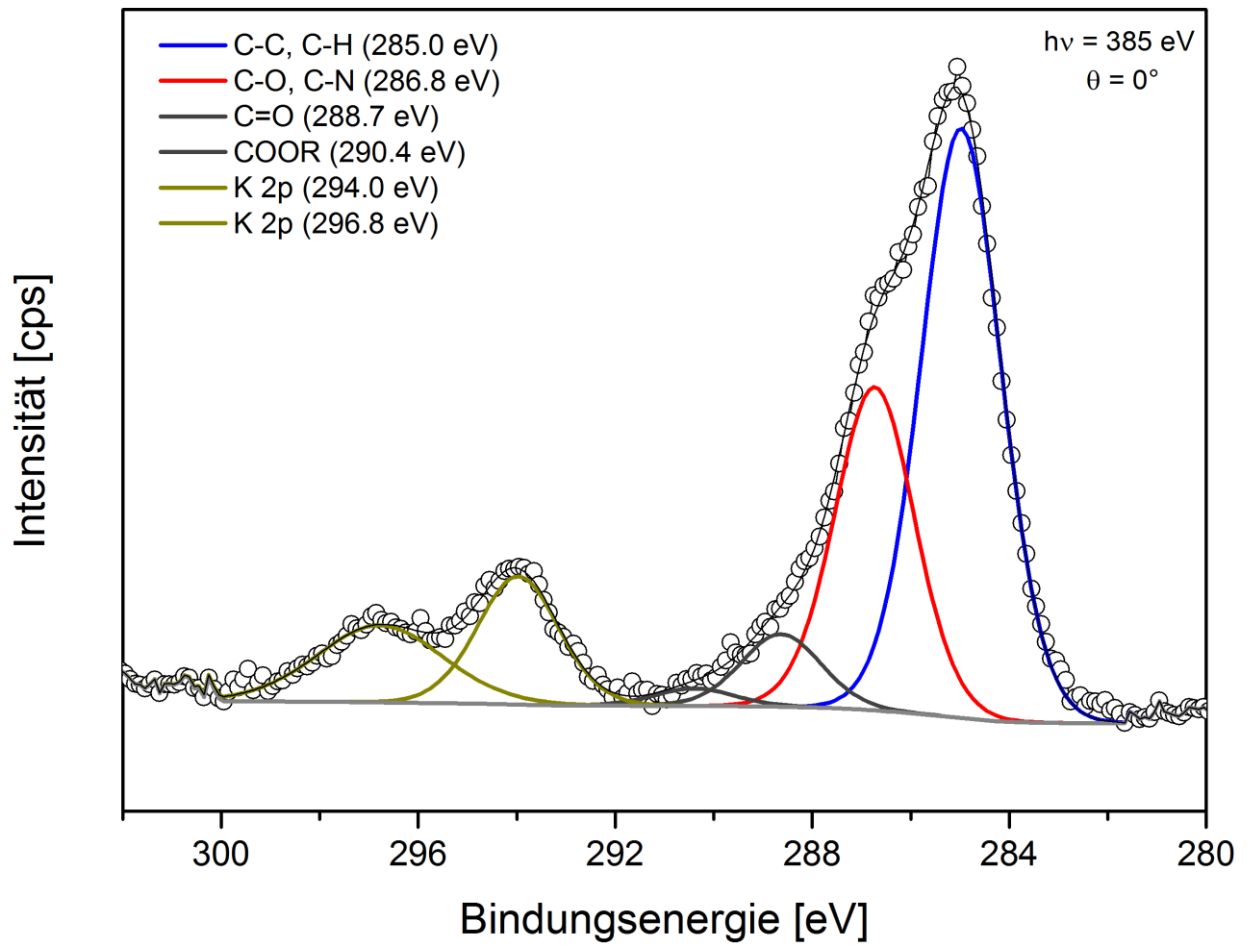
Anhang 8: XPS Übersichtsspektrum von Concanavalin A auf einer Epoxidoberfläche nach Absättigung der verbliebenen freien Epoxidgruppen mit Ethanolamin (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60° , Informationstiefe von 5.7 nm).



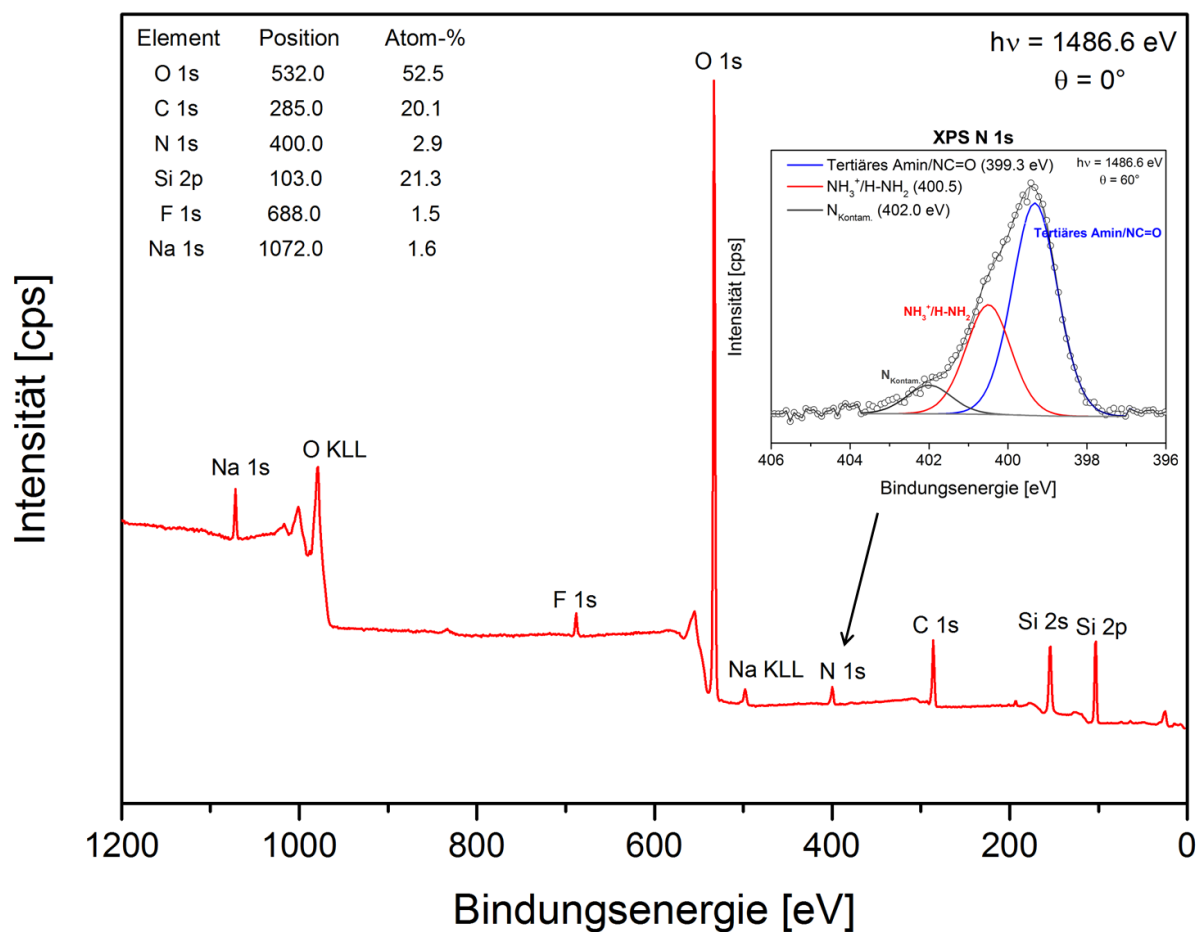
Anhang 9: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes XPS N1s-Spektrum der Glc₄-AB-Spots (ungewaschen) auf Epoxid-funktionalisierter Glasoberfläche (Al K α , h ν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).



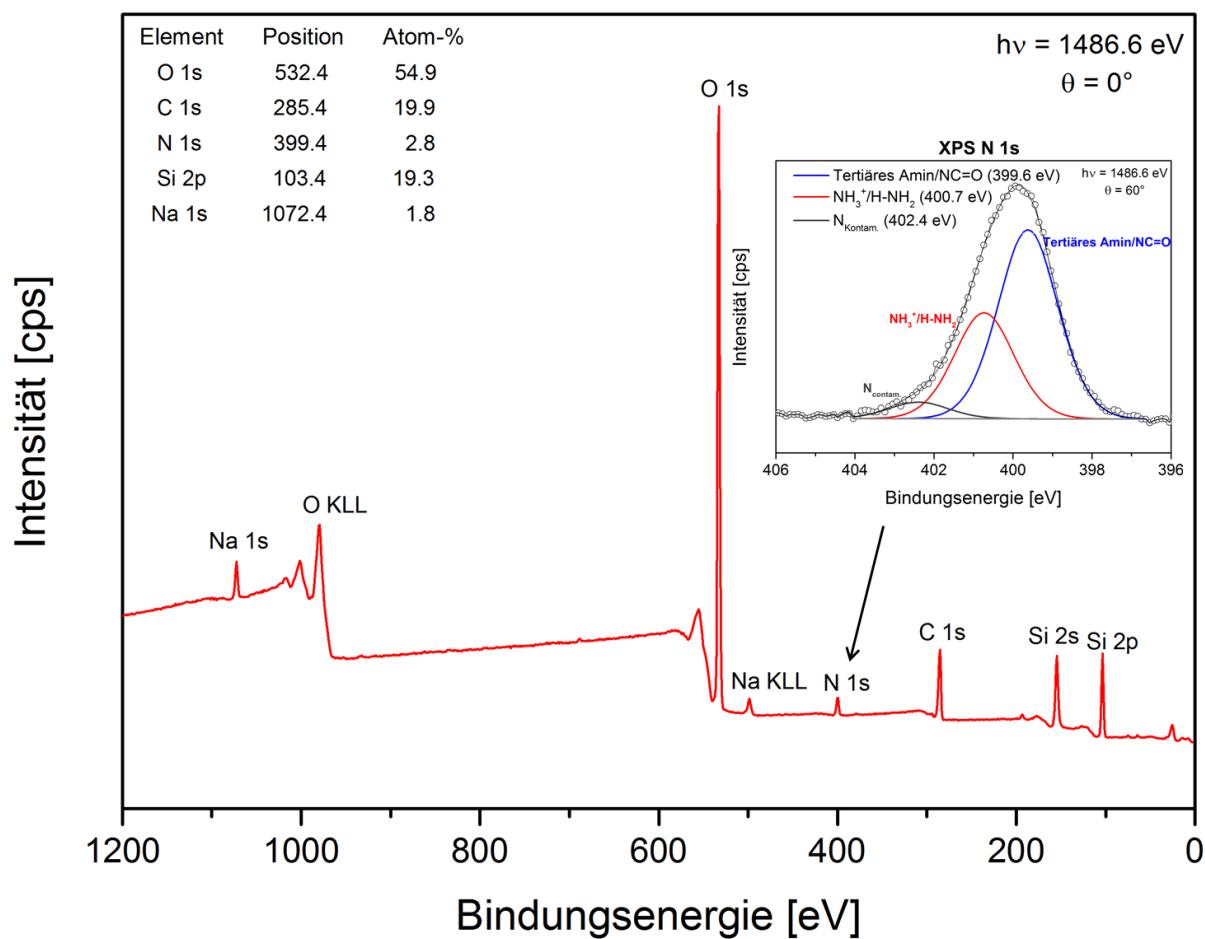
Anhang 10: XPS Übersichtsspektrum der GOPTS Glasoberfläche außerhalb des gespotteten Bereichs (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).



Anhang 11: Hochaufgelöstes C1s Spektrum einer GOPTS-funktionalisierten Oberfläche außerhalb des gespotteten Bereichs (Al K α , $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0° , Informationstiefe von $\sim 10 \text{ nm}$).



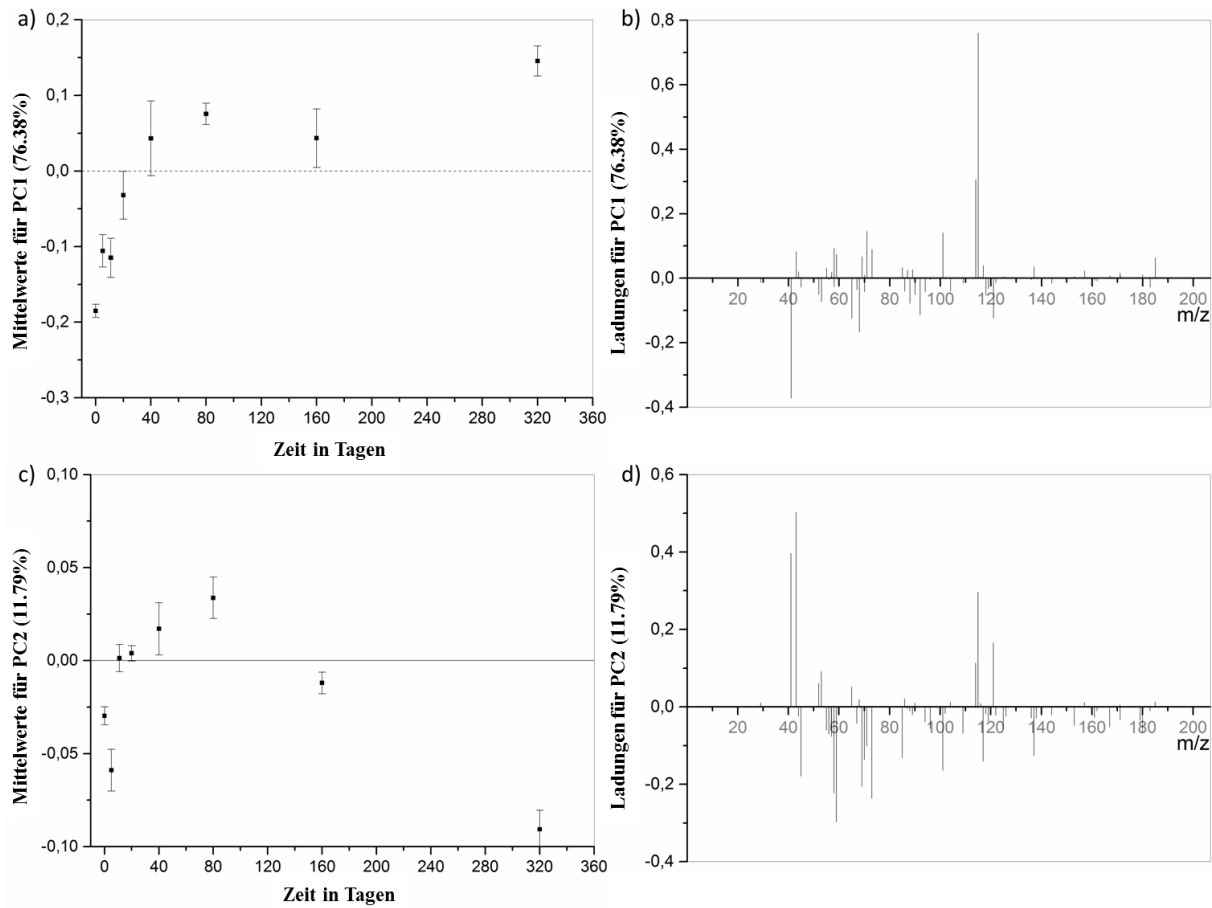
Anhang 12: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes XPS N1s-Spektrum in einem Glc₄-AB-Spot auf einer Glasoberfläche nach 5 Tagen Lagerung (Al K α , h ν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).



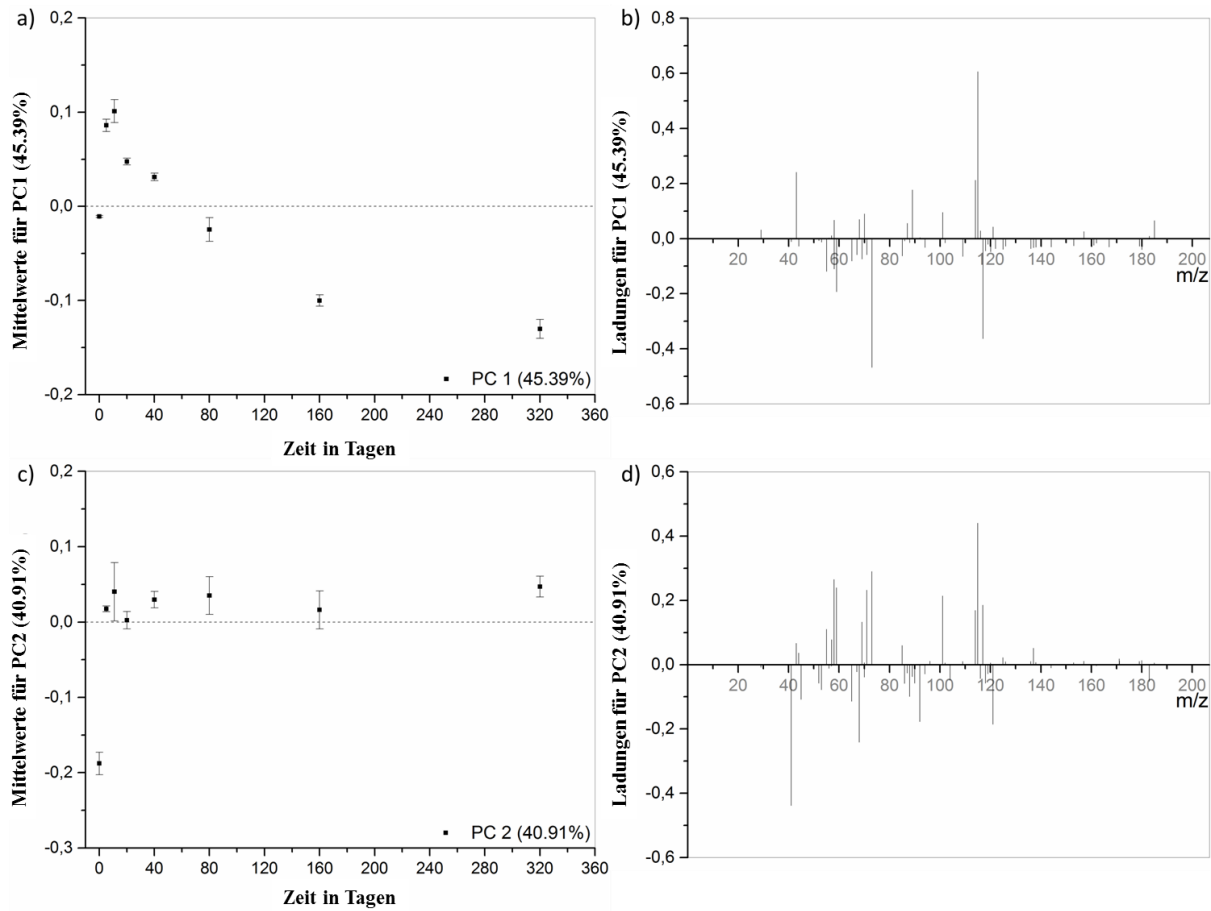
Anhang 13: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes XPS N1s-Spektrum in einem Glc₄-AB-Spot auf einer Glasoberfläche nach 160 Tagen Lagerung (Al K α , h ν = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).

m/z	Fragment	A Glc ₄ -AB		B Glc ₄ -AB		m/z	Fragment	A Glc ₄ -AB		B Glc ₄ -AB	
		PC1	PC2	PC1	PC2			PC1	PC2	PC1	PC2
29,0026	CHO ⁻	-	+	-	+	C ₄ H ₅ O ₃ ⁻	101,0276	+	+	+	+
41,0034	C ₂ HO ⁻	-	-	-	-	C ₄ H ₆ O ₃ ⁻	102,0306	-	+	+	-
43,0195	C ₂ H ₃ O ⁻	+	+	-	+	C ₄ H ₈ O ₃ ⁻	104,0421	-	-	-	-
43,9904	CO ₂ ⁻	+	+	+	-	C ₆ H ₅ O ₂ ⁻	109,0348	-	-	+	-
44,9989	CHO ₂ ⁻	-	+	-	-	C ₅ H ₆ O ₃ ⁻	114,0283	+	-	+	+
51,9963	C ₃ O ⁻	-	-	-	-	C ₅ H ₇ O ₃ ⁻	115,0259	+	-	-	+
53,0044	C ₃ HO ⁻	-	-	-	-	C ₈ H ₄ O ⁻	116,028	-	-	-	-
55,0211	C ₃ H ₃ O ⁻	+	+	+	-	C ₄ H ₅ O ₄ ⁻	117,0242	+	-	+	-
56,0156	C ₂ H ₂ NO ⁻	+	+	+	+	C ₄ H ₆ O ₄ ⁻	118,034	-	-	-	-
56,9998	C ₂ HO ₂ ⁻	+	+	-	+	C ₈ H ₇ O ⁻	119,0532	-	-	-	-
57,0374	C ₃ H ₅ O ⁻	+	+	+	+	C ₄ H ₈ O ₄ ⁻	120,05	-	-	+	-
58,0075	C ₂ H ₂ O ₂ ⁻	+	+	+	+	C ₄ H ₉ O ₄ ⁻	121,0351	-	+	-	-
58,0317	C ₂ H ₄ NO ⁻	+	+	+	+	C ₇ H ₆ O ₂ ⁻	122,0305	-	+	+	-
59,0159	C ₂ H ₃ O ₂ ⁻	+	+	+	-	C ₆ H ₅ O ₃ ⁻	125,0333	+	-	+	-
65,0034	C ₄ HO ⁻	-	-	-	-	C ₆ H ₆ O ₃ ⁻	126,0315	+	-	+	-
67,0192	C ₄ H ₃ O ⁻	-	-	+	-	C ₄ H ₈ O ₅ ⁻	136,047	-	-	+	-
68,0155	C ₃ H ₂ NO ⁻	-	-	-	-	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,0324	+	-	+	+
69,0372	C ₄ H ₅ O ⁻	+	-	+	-	C ₇ H ₆ O ₃ ⁻	138,0303	-	-	+	-
70,007	C ₃ H ₂ O ₂ ⁻	+	+	+	+	C ₆ H ₈ O ₄ ⁻	144,0517	-	-	+	-
70,032	C ₃ H ₄ NO ⁻	+	+	-	+	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153,03	+	-	+	-
71,0156	C ₃ H ₃ O ₂ ⁻	+	+	+	+	C ₇ H ₉ O ₄ ⁻	157,0394	+	-	-	+
73,0317	C ₃ H ₅ O ₂ ⁻	+	-	+	-	C ₆ H ₉ O ₅ ⁻	161,0393	-	-	+	-
85,0338	C ₄ H ₅ O ₂ ⁻	+	+	+	-	C ₉ H ₆ O ₃ ⁻	162,0315	-	-	+	-
86,0017	C ₃ H ₂ O ₃ ⁻	-	-	-	-	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167,0444	+	-	+	-
87,0101	C ₃ H ₃ O ₃ ⁻	+	-	-	+	C ₈ H ₁₁ O ₄ ⁻	171,055	+	-	+	+
88,0189	C ₃ H ₄ O ₃ ⁻	-	-	-	-	C ₁₀ H ₁₉ O ₂ ⁻	171,1413	+	+	+	+
89,0233	C ₃ H ₅ O ₃ ⁻	+	+	-	+	C ₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	179,0433	+	-	+	-
90,0358	C ₃ H ₆ O ₃ ⁻	-	-	-	-	C ₆ H ₁₂ O ₆ ⁻	180,0412	+	-	+	-
92,0246	C ₆ H ₄ O ⁻	-	-	-	-	C ₈ H ₇ O ₅ ⁻	183,0167	-	-	-	-
94,0321	C ₅ H ₄ NO ⁻	-	-	-	-	C ₈ H ₉ O ₅ ⁻	185,0336	+	-	-	+
96,0484	C ₅ H ₆ NO ⁻	+	+	+	+						

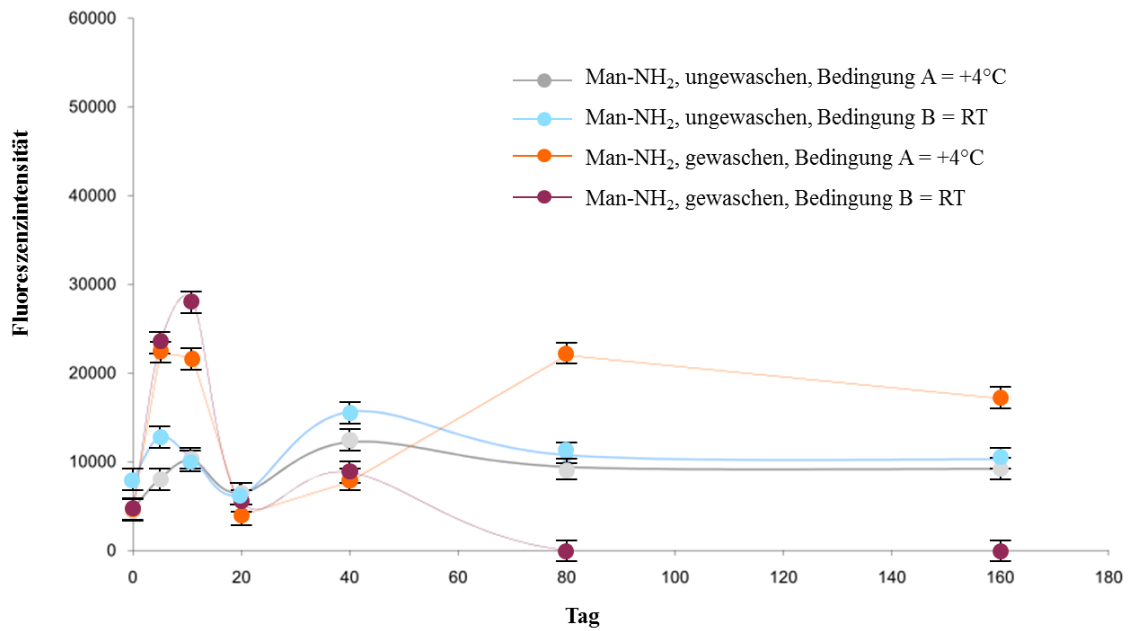
Anhang 14: Reduzierte ToF-SIMS-Peakliste für PCA mit der Zuordnung der Sekundärionenfragmente der Glykane (Glc₄-AB). + und - zeigen jeweils an, ob die Variable in dem entsprechenden „loadings plot“ positiv oder negativ ist.



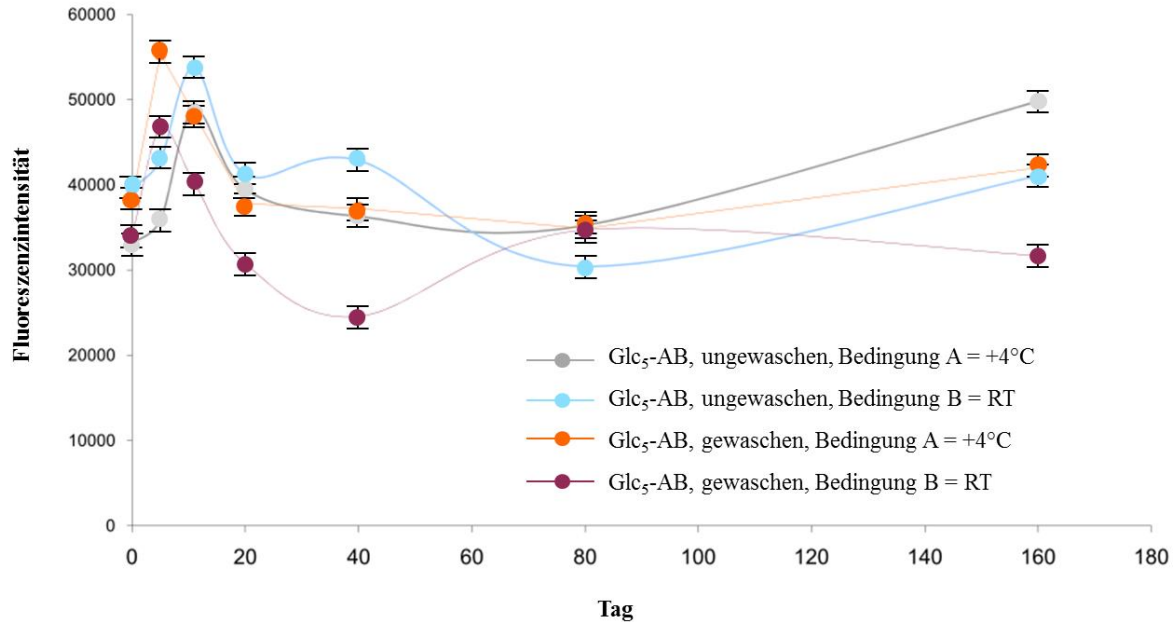
Anhang 15: ToF-SIMS/PCA Analysen der Glc₅-AB-Spots auf Glasoberflächen nach Lagerung im Kühlschrank bei 4°C (an der Atmosphäre) bei verschiedenen Lagerungszeiten (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 Tage). Die Punkte sind als Durchschnittswerte für wiederholte Analysen mit einem 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken dargestellt. Die „mean scores“ für PC1 werden in Abbildung (a) und für PC2 in Abbildung (c) gezeigt. Entsprechende „loadings“ für PC1 und PC2 werden in Abbildung (b) und (d) gezeigt.



Anhang 16: ToF-SIMS/PCA Analysen der Glc₅-AB-Spots auf Glasoberflächen nach Lagerung im Exsikkator bei Raumtemperatur (an der Atmosphäre) bei verschiedenen Lagerungszeiten (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 Tage). Die Punkte sind als Durchschnittswerte für wiederholte Analysen mit einem 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken dargestellt. Die „mean scores“ für PC1 werden in Abbildung (a) und für PC2 in Abbildung (c) gezeigt. Entsprechende „loadings“ für PC1 und PC2 werden in Abbildung (b) und (d) gezeigt.



Anhang 17: Positivkontrolle: Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation der Glykanspots (Man-NH₂) auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit ConA-Cy3 nach 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 Tagen Lagerung bei 4°C (Bedingung A) und 22°C (Bedingung B) jeweils vor und nach dem Waschen der frischen Glykan-Microarrays.



Anhang 18: Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation der Glykanspots (Glc₅-AB) auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit ConA-Cy3 nach 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 Tagen Lagerung bei 4°C (Bedingung A) und 22°C (Bedingung B) jeweils vor und nach dem Waschen der frischen Glykan-Microarrays.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] a) T. Joos, *www.BioChipNet.de*, 2010.
b) H. J. Müller, T. Röder; *Der Experimentator: Microarrays*, 2004, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- [2] a) F. Qin, S. S. Florian, J. S. William, Z. Pingbo, E. V. E. Jennifer, *Proteomics - Clinical Applications*, 2010, 4, 271-284.
b) R. P. Ekin; *Clinical Chemistry*, 1998, 44, 2015-2030.
- [3] R. P. Ekins, *Clinical Chemistry*, 1998, 44, 2015-2030.
- [4] M. Dubey, K. Emoto, F. Cheng, L. J. Gamble, H. Takahashi, D.W. Grainger, D.G. Castner, *Surface and Interface Analysis*, 2009, 41, 645-652.
- [5] P. M. Dietrich, T. Horlacher, P.-L. Girard-Lauriault, T. Gross, A. Lippitz, H. Min, T. Wirth, R. Castelli, P. Seeberger, W. E. S. Unger, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 30, 361-372.
- [6] D.J. Scurr; T. Horlacher, M.A. Oberli, D.B. Werz, L. Kroeck, S. Bufali, P. H. Seeberger, A. G. Shard, M.R. Alexander, *Langmuir*, 2010, 26, 17143-17155.
- [7] K. Cammann, *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 2003, 5, 5159-5168.
- [8] P. Mitchell, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 225-229.
- [9] K. L. Knudtson et al., *Journal of Biomolecular Techniques*, 2006, 17, 176-186.
- [10] a) I. Shin, S. Park, M. Lee; *Chemistry - A European Journal*, 2005, 11, 2894-2901.
b) F. Stahl; *Chemie in unserer Zeit*, 2005, 39, 188-194.
c) T. Horlacher, P. H. Seeberger; *BIOspektrum*, 2006, 12, 17-52.
- [11] P. Angenendt, *Drug Discovery Today*, 2005, 10, 503-511.
- [12] Y. Nannya et al., *Cancer Research*, 2005, 65, 6071-6079.
- [13] R. Ekins, F. Chu, J. Micallef, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1989, 4, 59-78.
- [14] K. V. Klenin, W. Kusnezow, J. Langowski, *Journal of Chemical Physics*, 2005, 122, 214-215.
- [15] J. Sobek, K. Bartscherer, A. Jacob, J. D. Hoheisel, P. Angenendt, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2006, 9, 365-380.
- [16] A. Hucknall et al., *Advanced Materials*, 2009, 21, 1968-1971.

- [17] P. Angenendt, H. Lehrach, J. Kreutzberger, J. Glokler, *Proteomics*, 2005, 5, 420-425.
- [18] Y. Lee et al., *Proteomics*, 2003, 3, 2289-2304.
- [19] G. MacBeath, *Nature Genetics*, 2002, 32, 526-532.
- [20] G. MacBeath, S. Schreiber, *Science*, 2000, 289, 1760-1763.
- [21] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Journal of the American Chemical Society* 1999, 121, 7967-7968.
- [22] A. J. Tudos, G. A. J. Besselink, R. B. M. Schasfoort, *Lab on a Chip*, 2001, 1, 83-95.
- [23] N. Pastor-Navarro, E. M. Brun, E. Gallego-Iglesias, A. Maquieira, R. Puchades, *Journal of Environmental Monitoring*, 2009, 11, 1094-1100.
- [24] C. R. Taitt, G. P. Anderson, B. M. Lingerfelt, M. J. Feldstein, F. S. Ligler, *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 6114-6120.
- [25] J. W. Silzel, B. Cercek, C. Dodson, T. Tsay, R. J. Obremski, *Clinical Chemistry*, 1998, 44, 2036-2043.
- [26] R. A. Irizarry et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 1-8.
- [27] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science*, 1995, 270, 467-470.
- [28] A. Herbert et al., *Science*, 2006, 312, 279-283.
- [29] H. Zhu et al., *Science*, 2001, 293, 2101-2105.
- [30] F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature*, 2002, 416, 653-657.
- [31] A. Kramer et al., *Phytochemistry*, 2004, 65, 1777-1784.
- [32] T. Bacarese-Hamilton, J. Gray, A. Crisanti, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2003, 5, 278-284.
- [33] A. Lueking et al., *Analytical Biochemistry*, 1999, 270, 103-111.
- [34] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annual Review of Biochemistry*, 1988, 57, 785-838.
- [35] A. Varki, *Glycobiology*, 1993, 3, 97-130.
- [36] R. A. Dwek, *Chemical Reviews*, 1996, 96, 683-720.
- [37] R. Raman, S. Raguram, G. Venkataraman, J. C. Paulson, R. Sasisekharan, *Nature Methods*, 2005, 2, 817-824.
- [38] L. Stryer, *Biochemistry*, 6 edn, 2007, W. H. Freeman and Co., New York City (NY).

- [39] A. Varki et al., *Essentials of glycobiology*, 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- [40] P. Scheiffele, J. Peranen, K. Simons, *Nature*, 1995, 378, 96-98.
- [41] B. E. Collins, J. C. Paulson, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8, 617-625.
- [42] P. R. Crocker, *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12, 609-615.
- [43] E. H. Song, N. L. B. Pohl, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13, 626-632.
- [44] J. Stevens, O. Blixt, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4, 857-864.
- [45] J. Stevens et al., *Journal of Molecular Biology*, 2006, 355, 1143-1155.
- [46] J. Stevens et al., *Journal of Molecular Biology*, 2008, 381, 1382-1394.
- [47] E. W. Adams et al., *Chemistry & Biology*, 2004, 11, 875-881.
- [48] J. C. Manimala, T. A. Roach, Z. T. Li, J. C. Gildersleeve, *Glycobiology*, 2007, 17, 17C-23C.
- [49] S. Park, M. R. Lee, I. Shin, *Chemical Society Reviews*, 2008, 37, 1579-1591.
- [50] L. L. Kiessling, C. W. Cairo, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 234-235.
- [51] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature*, 2007, 446, 1046-1051.
- [52] S. M. Chen et al., *Nature Methods*, 2007, 4, 437-444.
- [53] N. Blow, *Nature*, 2009, 457, 617-622.
- [54] M. P. Campbell, L. Royle, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, P. M. Rudd, *Bioinformatics*, 2008, 24, 1214-1216.
- [55] D. X. Wen et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 21011-21019.
- [56] R. W. Compans, *Journal of Virology*, 1974, 14, 1307-1309.
- [57] J. Hirabayashi et al., *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2002, 1572, 232-254.
- [58] J. P. McCoy, J. Varani, I. J. Goldstein, *Analytical Biochemistry*, 1983, 130, 437-444.
- [59] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chemistry & Biology*, 2002, 9, 443-454.
- [60] H. Zorbas, F. Lottspeich, *Bioanalytik*, 2 edn, 2006, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [61] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science*, 2001, 291, 1523-1527.

- [62] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 14397-14402.
- [63] C. W. Prince et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262, 2900-2907.
- [64] I. G. Boneca, Z. H. Huang, D. A. Gage, A. Tomasz, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 9910-9918.
- [65] T. Horlacher, P. H. Seeberger, *Chemical Society Reviews*, 2008, 37, 1414-1422.
- [66] P. W. Tang, H. C. Gool, M. Hardy, Y. C. Lee, T. Feizl, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985, 132, 474-480.
- [67] D. N. Wang, S. Y. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. L. Wang, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 275-281.
- [68] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. G. Chai, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 1011-1017.
- [69] S. J. Park, I. J. Shin, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002, 41, 3180-3182.
- [70] C.-Y. Wu, P.-H. Liang, C.-H. Wong, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2009, 7, 2247-2254.
- [71] I. Shin, J. Tae, S. Park, *Current Chemical Biology*, 2007, 1, 187-199.
- [72] J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nature Chemical Biology*, 2006, 2, 238-248.
- [73] O. Blixt et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101, 17033-17038.
- [74] O. Carion et al., *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 2006, 7, 817-826.
- [75] S. Park, M. R. Lee, I. Shin, *Nature Protocols*, 2007, 2, 2747-2758.
- [76] S. Park, I. Shin, *Organic Letters*, 2007, 9, 1675-1678.
- [77] Z. C. Sun, Z. Wei, K. M. Wei, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35, 598-601.
- [78] G. M. Hwang, L. Pang, E. H. Mullen, Y. Fainman, *IEEE Sensors Journal*, 2008, 8, 2074-2079.
- [79] M. C. Bryan et al., *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 8640-8641.
- [80] S. Park, M. R. Lee, S. J. Pyo, I. Shin, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 4812-4819.
- [81] O. Blixt, J. Hoffmann, S. Svenson, T. Norberg, *Glycoconjugate Journal*, 2008, 25, 27-36.

- [82] D. M. Ratner et al., *ChemBiochem: a European journal of chemical biology*, 2004, 5, 379-382.
- [83] C. K. Hartmuth, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie*, 2001, 113, 2056-2075.
- [84] O. J. Barrett, A. Pushechnikov, M. L. Wu, M. D. Disney, *Carbohydrate Research*, 2008, 343, 2924-2931.
- [85] X. L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17, 52-57.
- [86] O. Michel, B. J. Ravoo, *Langmuir*, 2008, 24, 12116-12118.
- [87] S. Park, M. R. Lee, I. Shin, *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20, 155-162.
- [88] K. S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 13162-13163.
- [89] L. L. de Paz et al., *ACS Chemical Biology*, 2007, 2, 735-744.
- [90] C. I. Gama et al., *Nature Chemical Biology*, 2006, 2, 467-473.
- [91] L. Nimrichter et al., *Glycobiology*, 2004, 14, 197-203.
- [92] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chemistry & Biology*, 2004, 11, 1701-1707.
- [93] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 2002, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [94] D. Calarese et al., *Carbohydrate Drug Design*, 2006, 932, 161-185.
- [95] M. J. Fine et al., *Archives of Internal Medicine*, 1994, 154, 2666-2677.
- [96] WHO (World Health Organization), 2003, in the Weekly Epidemiological Record 110-119.
- [97] Parkkali et al., *Bone Marrow Transplantation*, 1999, 24, 671-678.
- [98] T. K. Lindhorst, „*Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*“, 2000, 1-2, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- [99] L. Stryer, „*Biochemie*“, 1994, 345-361, Ed., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- [100] A. Wollrab: „*Organische Chemie: Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten*“, 2014, 845, Springer, ISBN 978-3-642-45144-7.
- [101] R. U. Lemieux, *Accounts of Chemical Research*, 1996, 29, 373-380.

- [102] a) G. A. Rabinovich, N. Rubinstein, M. A. Toscano, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1572, 274-284.
- b) E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, *Immunologic Research*, 2007, 37, 47-60.
- [103] a) R. A. Dwek, *Chemical Reviews*, 1996, 683-720.
- b) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Accounts of Chemical Research*, 1995, 28, 321-327.
- [104] H. Lis, N. Sharon, *Chemical Reviews*, 1998, 98, 637-674.
- [105] N. Sharon, H. Lis, *Spektrum der Wissenschaft*, 1993, 66-74.
- [106] H. S. Mader, O. S. Wolfbeis, *Microchimica Acta*, 2008, 162, 1-34.
- [107] S. M. Borisov, O. S. Wolfbeis, *Chemical Reviews*, 2008, 108, 423-461.
- [108] H. Dodziuk, *Journal of Molecular Structure*, 2002, 614, 33-45.
- [109] J. Szejtli, *Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins*, in: J. Szejtli, T. Osa, (Ed.). *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, 1996, Vol. 3, *Cyclodextrins*, Pergamon, Oxford, 5-40.
- [110] J. Szejtli, *Inclusion of Guest Molecules, Selectivity and Molecular Recognition by Cyclodextrins*, in: J. Szejtli, T. Osa, (Ed.); *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3, *Cyclodextrins*, Pergamon, Oxford, 1996, S. 57-188.
- [111] F. Cramer, W. Saenger, H.-Ch. Spatz, *Journal of the American Chemical Society*, 1, 1967, 89, 14-20.
- [112] L. Liu, Q.-X. Guo, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 1/2, 2002, 42, 1-14.
- [113] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 2006, Wiley-VCH, Weinheim.
- [114] K.-H. Frömming, *Pharmazie in unserer Zeit* 4, 1973, 109-115.
- [115] Firmeninformationen Wacker-Chemie (München), Die Chemie vom "Wirt und Gast", *Wacker Werk+Wirken*, 1998, 1, 20-25.
- [116] M. Masson, Th. Loftsson, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 225, 15-30.
- [117] B. Siegel, R. Breslow, *Journal of the American Chemical Society*, 1975, 97, 6869-6870.
- [118] A. Harada, S. Takahashi, *Chemical Communications*, 1984, 645-646.
- [119] N. Kobayashi, T. Osa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1991, 64, 1878-1883.

- [120] A. U. Moozyckine, J. L. Bookham, M. E. Deary, D. M. Davies, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2001, 1858-1862.
- [121] Y. Odagaki, K. Hirotsu, T. Higuchi, A. Harada, S. Takahashi, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*, 1990, 1230-1231.
- [122] J. Liu, A. Mushegian, *Protein Science*, 2003, 12, 1418-1431.
- [123] B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 22907-22911.
- [124] D. I. Liao, G. Kapadia, H. Ahmed, G. R. Vasta, O. Herzberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 1994, 91, 1428-1432.
- [125] H. Lis, N. Sharon, *Annual Review of Biochemistry*, 1986, 55, 35-67.
- [126] A. N. Zelensky, J. E. Gready, *The FEBS Journal*, 2005, 272, 6179-6217.
- [127] H. Stillmark, *Inaugural-Dissertation*, Schnakenburgs Buchdruckerei, Dorpat 1888.
- [128] J. B. Sumner, *Journal of Biological Chemistry*, 1919, 37, 137-142.
- [129] J. B. Sumner, *Journal of Bacteriology*, 1936, 32, 227-237.
- [130] S. S. Komath, M. Kavitha, M. J. Swamy, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4, 973-988.
- [131] I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein, *Molecular Biology*; „The Lectins“; 9.
- [132] T. K. Chowdhury, A. K. Weiss (Hrsg.): *Concanavalin A.*, 1975, Plenum Press, New York.
- [133] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1383, 9-36.
- [134] C. Emmerich, J. R. Helliwell, M. Redshaw, J. H. Naismith, S. J. Harrop, J. Raftery, J. A. Kalb (Gilboa), J. Yariv, Z. Dauter, K. S. Wilson, *Acta Crystallographica*, 1994, D50, 749-756.
- [135] B. Shaanan, H. Lis, N. Sharon, *Science*, 1991, 254, 862-866.
- [136] N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, 1989, Chapman and Hall, London.
- [137] H.-J. Gabius, *Glycoconjugate Journal*, 2001, 30, 3-31.

- [138] F.-T. Liu, R. J. Patterson, J. L. Wang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1572, 263-273.
- [139] J. C. Love, L. A. Estro, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chemical Reviews*, 2005, 105, 1103-1169.
- [140] J. J. Gooding, F. Mearns, W. R. Yang, J. Q. Liu, *Electroanalysis*, 2003, 15, 81-96.
- [141] M. Kind, C. Wöll, *Progress in Surface Science*, 2009, 84, 230-278.
- [142] F. Schreiber, *Progress in Surface Science*, 2000, 65, 151-256.
- [143] F. Schreiber, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2004, 16, R881-R900.
- [144] A. Ulman, Self-Assembled Monolayers of Thiols, *Elsevier Science and Technology*, 1998, 14, 3815-3819.
- [145] S. Kramer, R. R. Fuierer, C. B. Gorman, *Chemical Reviews*, 2003, 103, 4367-4418.
- [146] N. Sandhyarani, T. Pradeep, *International Reviews in Physical Chemistry*, 2003, 22, 221-262.
- [147] A. S. Duwez, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2004, 134, 97-214.
- [148] C. Vericat, M. E. Vela, G. A. Benitez, J. A. M. Gago, X. Torrelles, R. C. Salvarezza, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2006, 18, R867-R900.
- [149] G. Witte, C. Wöll, *Phase Transitions*, 2003, 76, 291-305.
- [150] G. Witte, C. Wöll, *Journal of Materials Research*, 2004, 19, 1889-1916.
- [151] H. B. Akkerman, B. de Boer, *Journal of Physics.: Condensed Matter*, 2008, 20.
- [152] A. Facchetti, S. A. DiBenedetto, M. A. Ratner, T. J. Marks, *Advanced Materials*, 2009, 21, 1407-1433.
- [153] E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, *Langmuir*, 2001, 17, 6336-6343.
- [154] R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides, *Langmuir*, 2003, 19, 2388-2391.
- [155] E. Boubour, R. B. Lennox, *Langmuir*, 2000, 16, 7464-7470.
- [156] K. Sugihara, K. Shimazu, K. Uosaki, *Langmuir*, 2000, 16, 7101-7105.
- [157] W. Azzam, P. Cyganik, G. Witte, M. Buck, C. Wöll, *Langmuir*, 2003, 19, 8262-8270.
- [158] W. Azzam, C. Fuxen, A. Birkner, H. T. Rong, M. Buck, C. Wöll, *Langmuir*, 2003, 19, 4958-4968.

- [159] R. G. Nuzzo, L. D. Allara, *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 4481-4483.
- [160] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann; *Angewandte Chemie*, 2008, 120, 9762-9792; *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008, 47, 9618-9647.
- [161] P. Pallavicini, G. Dacarro, M. Galli, M. Partini, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 332, 432-438.
- [162] W. Azzam, B. I. Wehner, R. A. Fischer, A. Terfort, C. Wöll, *Langmuir*, 2002, 18, 7766-7769.
- [163] R. Arnold, W. Azzam, A. Terfort, C. Wöll, *Langmuir*, 2002, 18, 3980-3992.
- [164] I. Rubinstein, S. Steinberg, Y. Tor, A. Shanzer, J. Sagiv, *Nature*, 1988, 332, 426-429.
- [165] K. Uosaki, Y. Sato, H. Kita, *Langmuir*, 1991, 7, 1510-1514.
- [166] C. C. Barrias, C. L. Martins, C. S. Miranda, M. A. Barbosa, *Biomaterials*, 2005, 26, 2695-2704.
- [167] G. C. Herdt, D. R. Jung, A. W. Czanderna, *Progress in Surface Science*, 1995, 50, 103-129.
- [168] G. C. Herdt, A. W. Czanderna, *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films*, 1999, 17, 3415-3418.
- [169] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 4481-4483.
- [170] C. Boozer, S. Chen, S. Jiang, *Langmuir*, 2006, 22, 4694-4698.
- [171] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science*, 1991, 252, 1164-1167.
- [172] N. Bunjes, E. K. Schmidt, A. Jonczyk, F. Rippmann, D. Beyer, H. Ringsdorf, P. Gräber, W. Knoll, R. Naumann, *Langmuir*, 1997, 13, 6188-6194.
- [173] S. Flink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2001, 14, 407-415.
- [174] Sabbatini (Ed.), *Surface Characterization of Advanced Polymers*, 1992, WILEY-VCH.
- [175] Pan, Castner, Ratner, *Langmuir*, 1998, 14, 3545-3550.
- [176] Briggs, Munro, *Polymer Communications*, 1987, 28, 307-309.
- [177] L. J. Gerense, J. F. Elman, M. G. Mason, J. M. Pochan, *Polymer*, 1985, 26, 1162-1166.
- [178] Gombotz, Hoffman, *Journal of Applied Polymer Science*, 1988, 42, 285-303.

- [179] A. Holländer, *Surface and Interface Analysis*, 2004, 36, 1023-1026.
- [180] D.-S. Shin, K.-N. Lee, K.-H. Jang, J.-K. Kim, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19, 485-494.
- [181] H. Yuan, Y. Nishiyama, S. Kuga, *Cellulose*, 2005, 12, 543-549.
- [182] A. Meyer-Plath, J. Friedrich, *18th Int. Symp. Plasma Chem*, 2007, Dissertation, University Kyoto, Japan.
- [183] M. R. Alexander, P. V. Wright, B. D. Ratner, *Surface and Interface Analysis*, 1996, 24, 217-220.
- [184] A. Holländer, F. Pippig, Dubreuil, Vangeneugden, *Plasma Processes and Polymers*, 2008, 5, 345-349.
- [185] R. T. Morrison, R. K. Boyd, 1986, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 3. Auflage, VCH Weinheim.
- [186] A. Carey, R. J. Sundberg, 1995, *Organische Chemie*, VCH Weinheim.
- [187] R. E. Parker, N. S. Isaacs, *Chemical Reviews*, 1959, 59, 737-799.
- [188] E. S. Gould, *Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie*, 1964, VCH Weinheim.
- [189] S.vGorzynski, *Journal Synthesis*, 1984, 629-656.
- [190] V. A. Tarasevich, N. G. Kozlov, *Russian Chemical Reviews*, 1999, 68, 55-72.
- [191] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93, 2897-2904.
- [192] C. F. Lane, *Synthesis*, 1975, 135-146.
- [193] D. Locke, C. G. Bevans, L. X. Wang, Y. Zhang, A. L. Harris, Y. C. Lee, *Carbohydrate Research*, 2004, 339, 221-231.
- [194] J. M. J. Tronchet, B. Baehler, J.-B. Zumwald, *Helvetica Chimica Acta*, 1977, 60, 1932-1934.
- [195] A. Abbadi, H. van Bekkum, *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis*, R. A. Sheldon, H. van Bekkum, (Eds.), 2001, 380-388, Wiley-VCH, Weinheim.
- [196] S. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angewandte Chemie*, 1996, 108, 1325-1328; *Angewandte Chemie-International Edition*, 1996, 35, 1230-1232.
- [197] G. R. Gray, *Methods in Enzymology*, 1978, 50, 155-161.

- [198] Y. S. Sanghvi, *Carbohydrate Mimics*, Y. Chapleur, (Ed.), 1998, 523-536, Wiley-VCH, Weinheim.
- [199] H. Saito, Y. Nishimura, S. Kondo, K. Komura, T. Takeuchi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1988, 61, 2493-2497.
- [200] M. Kottenhahn, H. Harr, K. Drauz, A. G. Degussa, *Ger. Offen. DE 4123248*, 1993; *Chemical Abstract*, 1993, 119, P73120z.
- [201] D. J. Walton, E. R. Ison, W. A. Szarek, *Carbohydrate Research*, 1984, 128, 37-49.
- [202] J. D. Andrade, "*Surface and interfacial aspects of biomedical polymers, Vol 1: Surface chemistry and physics*", 1985, Plenum Press, New York.
- [203] J. C. Rivière, S. Myhra; Taylor & Francis Group, *Handbook of Surface and Interface Analysis*, 2009, CRC Press.
- [204] R. Holm, L. Morbitzer, S. Storp, 1977, *Kunststoffe* 67, 717-724.
- [205] K. Levsen, *Physikalische Methoden in der Chemie: ESCA*, *Chemie in unserer Zeit*, 1976, 10, 48-53.
- [206] C. Keck, R. Müller, „*Moderne Pharmazeutische Technologie*“, 2009, 78-82, 1. Auflage, Berlin.
- [207] M. Grasserbauer, H. J. Dudek, M. F. Ebel, „*Angewandte Oberflächenanalyse mit SIMS, AES und XPS*“, 1986, Akademie-Verlag Berlin.
- [208] C. J. Powell, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1988, 47, 197-214.
- [209] G. Busch, „*Charakterisierung und Applikation self-assemblyfähiger Moleküle auf oxidischen Oberflächen*“, 2005, 14-40, Dissertation der Technischen Universität Dresden.
- [210] R. Schlögl, G. Indlekofer, et al., *Angewandte Chemie*, 1987, 99, 312-322.
- [211] M. Bubek, „*Photoelektronenspektroskopie an Metallclustern*“, 2006, 14-25, Diplomarbeit der Universität Konstanz.
- [212] S. Kröpke, A. Holländer, „*Plasmaprozesse für funktionelle Polymeroberflächen, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*“, 2001, 32, 781-784.
- [213] V. Povstugar, S. Mikhailova, A. Shakov, *Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 55, 405-416.

- [214] F. Pippig, „*Synthese und Charakterisierung von Nanohydrogelschichten auf Polymeroberflächen*“, 2010, 17-33, Dissertation der Freien Universität Berlin.
- [215] Dissertation Eda Jagst, „*Surface Functional Group Characterization Using Chemical Derivatization X-ray Photoelectron Spectroscopy (CD-XPS)*“, 2011, 27, BAM-Dissertationsreihe, Band 69.
- [216] L. J. Gerense, J. F. Elman, M. G. Mason, J. M. Pochan, *Polymer*, 1985, 26, 1162-1166.
- [217] J. Haase, *Chemie in unserer Zeit*, 1992, 26, 219-231.
- [218] J. Fu, S. G. Urquhart, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005, 109, 11724-11732.
- [219] N. Ballav, B. Schupbach, O. Dethloff, P. Feulner, A. Terfort, M. Zhamikov, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 15416-15417.
- [220] J. C. Vickerman (Ed.), I. S. Gilmore (Ed.), *Surface Analysis – The Principal Techniques*, 2009, 4.1, 113-116, 2 nd Edition, Wiley.
- [221] Y. Ikada, H. Iwata, T. Matsunaga, M. Taniguchi, M. Suzuki, W. Taki, S. Yamagata, Y. Yonekawa, H. Handa, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1981, 15, 697-718.
- [222] Y. Ikada, T. Matsunaga, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1981, 84, 8-13.
- [223] Y. Ikada, Y. Tamada, *Polymer*, 1993, 34, 2208-2212.
- [224] P. B. Van Wachem, A. H. Hogt, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers, W. G. Van Aken, *Biomaterials*, 1987, 8, 323-328.
- [225] G. G. Stokes; *Philosophical Transactions*, 1985, 142, 463-562.
- [226] W. Schmidt; *Optische Spektroskopie*, 1994, VCH, Weinheim.
- [227] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 2005, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [228] C. Funk, P. M. Dietrich, T. Gross, H. Min, W. E. S. Unger, W. Weigel, *Surface and Interface Analysis*, 2012, 44, 890-894.
- [229] I. Luzinov et al, *Langmuir*, 2000, 16, 504-516.
- [230] D.-S. Shin, K.-N. Lee et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19, 485-494.
- [231] D. B. Knorr, C. Jaye, D. A. Fischer, A. B. Shoch, J. L. Lenhart, *Langmuir*, 2012, 28, 15294-15304.

- [232] R. A. Dickie, J. S. Hammond, J. E. de Vries, J. W. Holubka, *Analytical Chemistry*, 1982, 54, 2045-2049.
- [233] D. A. Outka, J. Stöhr, R. J. Madix, H. H. Rotermund, B. Hermsmeier, J. Solomon. *Surface Science*, 1987, 185, 53-74.
- [234] J. Stöhr, *NEXAFS Spectroscopy*, Springer Verlag; Heidelberg; 1992.
- [235] O. Dhez, H. Ade, S. G. Urquhart, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2003, 128, 85-96.
- [236] G. Nelles, M. Weisser, R. Back, P. Wohlfahrt, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118, 5039-5046.
- [237] M. Weisser, G. Nelles, G. Wenz, S. Mittler-Neher, *Sensors & Actuators B*, 1997, 39, 58-67.
- [238] M. De Paoli, *Dissertation*, Universität Karlsruhe.
- [239] N. Graf, E. Yegen, T. Gross, A. Lippitz, W. Weigel, S. Krakert, A. Terfort, W. E. S. Unger, *Surface Science*, 2009, 603, 2849-2860.
- [240] C. Richter, L. Menon, *Energy and Environmental Science*, 2010, 3, 427-433.
- [241] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, M. Zharnikov, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112, 4478-4480.
- [242] P.-S. G. Kim, N. O. Petersen, T. K. Sham, Y. F. Hu, *Chemical Physics Letters*, 2004, 392, 44-49.
- [243] M. Strehle, J. Popp, *Photonik 1*, 2005, 56-59.
- [244] P. M. Dietrich, W. E. S. Unger, *Analytik News*, 2010, 1-11.
- [245] N. V. Shilova, N. V. Bovin, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, 29, 309-324.
- [246] K. R. Anumula, *Analytical Biochemistry*, 2006, 350, 1-23.
- [247] J. W. Pickering et al., *American Journal of Clinical Pathology*, 2007, 128, 23-31.
- [248] M. Herold; *Modifikation von Festkörperoberflächen und ihre Charakterisierung durch Ellipsometrie, Dissertation*, 2001, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- [249] Private communication: Dr. E. Pittenauer, Vienna University of Technology, Chemistry Department, *Bio- and Polymer Analysis Research Group*.

- [250] B. Domon, C. E. Costello, *Glycoconjugate Journal*, 1988, 5, 397-409.
- [251] K. M. Bolles, F. Cheng, J. Burk-Rafel, M. Dubey, D. M. Ratner, *Materials*, 2010, 3, 3948-3964.
- [252] A. R. de Boer, C.H. Hokke, A. M. Deeider, M. Wuhrer, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 8107-811.
- [253] R. France, I. Cumpstey, T. Butters, A. Fairbanks, M. Wormald, *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, 24, 4985-4994.
- [254] E. Grill, C. Huber, P. J. Oefner, A. E. Vorndran, G. K. Bonn, *Electrophoresis*, 1993, 14, 1004-1010.
- [255] A. E. Vorndran, E. Grill, C. Huber, P. J. Oefner, G. K. Bonn, *Chromatographia*, 1992, 34, 109-114.
- [256] G. C. Bigge, T. P. Patel, J. A. Bruce, P. N. Goulding, S. M. Charles, R. B. Parekh, *Analytical Biochemistry*, 1995, 230, 229-238.
- [257] V. Blanchard, X. Liu, S. Eigel, M. Kaup, S. Rieck, S. Janciauskiene, V. Sandig, U. Marx, P. Walden, R. Tauber, M. Berger, *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108, 2118-2128.
- [258] A. A. E. Penglis, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1981, 38, 195-285.
- [259] W. Choong, N. C. Stephenson, J. D. Stevens, *Crystal Structure Communications*, 1975, 4, 491-496.
- [260] P. J. Card, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1985, 4, 451-487.
- [261] D. Briggs, M. P. Seah, *Practical Surface Analysis*, 1990; 52, John Wiley & Sons; Chichester; 2. Ausgabe.
- [262] ISO 15472, *Surface chemical analysis - X-ray photoelectron spectrometers – Calibration of energy scales*, 2010.
- [263] ISO 19318, *Surface chemical analysis - X-ray photoelectron spectroscopy - Reporting of methods used for charge control and charge correction*, 2004.
- [264] G. Beamson, D. Briggs, *High Resolution XPS of Organic Polymers* 26, 1992, Wiley, Chichester.
- [265] R. Hesse, Dissertation, Universität Leipzig 2006, Kap. 4, S. 39-55.

- [266] P. E. Batson, *Physical Review B*, 1993, 48, 2008-2610.
- [267] A. Ceroni, K. Maass, R. Geyer, A. Dell, S. M. Haslam, *Journal of Proteome Research*, 2008, 7, 1650-1659.
- [268] K. Maass, R. Ranzinger, H. Geyer, C. W. von der Lieth, R. Geyer, *Proteomics*, 2007, 7, 4435-4444.
- [269] P.-L. Girard-Lauriault, P.M. Dietrich, T. Gross, and W.E.S. Unger, *Surface and Interface Analysis*, 2012, 44, 1135-1140.

9. Abkürzungsverzeichnis

At-%	Atomprozent
ATFMP	2-Aminotrifluoromethylpyridin
AB	2-Aminobenzamid
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cyclodextrin
CD-NH ₂	Amino-Cyclodextrin
Con A	Concanavalin A
Cy3	Cyanin-Farbstoff (Gruppe: Polymethin-Farbstoffe)
EA	Ethanolamin
EtOH	Ethanol
eq	Äquivalent
Glc	Glucose
Glc-NH ₂ *HCl	Glucosamin Hydrochlorid
GOPTS	3-(glycidoxypropyl)trimethoxysilan
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MnCl ₂	Manganchlorid
Man-NH ₂	Mannosamin
m/z	in der MS: Verhältnis der relativen Molekülmasse m_r zur effektiven Anzahl z der Elementarladungen eines Ions (<i>mass-to-charge ratio</i>)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NEt ₃	Triethylamin
NEXAFS	Kantennahe-Röntgen-Absorptions-Feinstruktur-Spektroskopie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
SAM	selbst-assozierte Monolagen (<i>self-assembled monolayers</i>)
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFMBA	4-(Trifluormethyl)-benzylamin
ToF-SIMS	Flugzeit-Sekundärionen-Massen-Spektrometrie

Abkürzungsverzeichnis

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
WCA	Kontaktwinkelmessung (<i>water contact angle</i>)
XPS	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Funktionalisierte Substratoberfläche mit kovalent gebundenen Sonden und Analyten Interaktion.
Abbildung 2:	Microarray-Arten und ihre Verwendung.
Abbildung 3:	α -D-Glucopyranose in Fischer-Projektion, Haworth- und Sessel-Darstellung.
Abbildung 4:	α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin und γ -Cyclodextrin.
Abbildung 5:	Angenommene Strukturen der Ferrocenaddukte mit α -, β - und γ -CD.
Abbildung 6:	Struktur von Concanavalin A (Con A) in Tetramer-Form.
Abbildung 7a:	Schematische Darstellung einer selbstassozierten Monolage (SAM) auf Gold.
Abbildung 7b:	Mechanismus der Silanisierung.
Abbildung 8:	Reaktionsschema der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von Glykanen (R) mit Aminolinker.
Abbildung 9:	Reaktionsschema der reduktiven Aminierung.
Abbildung 10:	Modellhafter Prozess des äußeren photoelektrischen Effektes. Das primäre Röntgenphoton (a) erzeugt (b) ein Photoelektron (c).
Abbildung 11:	Kopplungsreaktion für die chemische Derivatisierung für die quantitative Analytik von Aminogruppen mittels XPS.
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der Elektronenanhebung mit Röntgenstrahlung bei NEXAFS.
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des ToF-SIMS-Prinzips. Rot: Primärion; Grün: positiv geladene Teilchen; Blau: negativ geladene Teilchen; Grau: neutrale Teilchen.
Abbildung 14a:	Schematische Darstellung zur Bestimmung des statischen Kontaktwinkels θ .
Abbildung 14b:	Quantitative Beschreibung des Kontaktwinkels.
Abbildung 15a:	XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) einer Siliziumwaferoberfläche.

- Abbildung 15b: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöstes Synchrotron XPS O1s Spektrum ($h\nu$ = 620 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von ~1 nm) einer GOPTS-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche **1**.
- Abbildung 16: XPS C1s Spektrum ($h\nu$ = 385 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und C K-NEXAFS-Spektrum (55° Einstrahlwinkel) (b) einer GOPTS-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche **1**.
- Abbildung 17: Reaktion von TFAA und TFMBA mit Epoxid-Gruppen auf Siliziumoberflächen.
- Abbildung 18: XPS Übersichtsspektrum einer mit TFAA derivatisierten GOPTS-Oberfläche **2** (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).
- Abbildung 19: Hochaufgelöste Synchrotron XPS C1s (a) und F1s (b) Spektren einer TFAA derivatisierten GOPTS-Oberfläche **2** ($h\nu$ = 385 eV und 780 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm).
- Abbildung 20: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s Spektren ($h\nu$ = 780 eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer TFMBA derivatisierten GOPTS-Oberfläche **3**.
- Abbildung 21: Hochaufgelöstes XPS C1s Spektrum ($h\nu$ = 385 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und C K-Kanten-NEXAFS-Spektrum (Spektrum der nicht derivatisierten Epoxidoberfläche **1** zum Vergleich eingefügt) (b) einer TFMBA derivatisierten GOPTS-Oberfläche **3**.
- Abbildung 22: Reaktion von Glc-NH₂*HCl mit Epoxidgruppen auf Siliziumoberflächen.
- Abbildung 23: Hochaufgelöste Synchrotron XPS C1s- (a) und N1s-Spektrum (b) einer Glc-NH₂-immobilisierten Oberfläche ($h\nu$ = 385 eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm).
- Abbildung 24: XPS Übersichtsspektren einer Glc-NH₂-immobilisierten Oberfläche mit einer Konzentration von 50 mM (a) und 300 mM (b) (Al K α , $h\nu$ = 1486,6 eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).

- Abbildung 25: Reaktionsschema der Immobilisierung von β -Amino-Cyclodextrin (R1) an einer Epoxidoberfläche (Oberfläche **5** und **6**) und indirekte Quantifizierung von nicht umgesetzten Epoxidgruppen mit TFMBA (R2, Oberfläche **6**).
- Abbildung 26: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöstes Synchrotron XPS N1s Spektrum ($h\nu = 500$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer CD-NH₂-immobilisierten Oberfläche **5**.
- Abbildung 27: Hochaufgelöste Synchrotron XPS C1s Spektren einer CD-NH₂ (CD)-immobilisierten Oberfläche **5** ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und einer Amino-Cyclodextrin-Referenzschicht, die auf einen Siliziumwafer mit spin coating aufgebracht wurde ($h\nu = 385$ eV, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von 1.1 nm) (b).
- Abbildung 28: Positives Sekundärionen-Massenspektrum (ToF-SIMS) einer β -Amino-Cyclodextrin-immobilisierten Oberfläche. Zum Vergleich wird das Spektrum der CD-NH₂-Referenzschicht, die auf einen Siliziumwafer mit spin coating aufgebracht wurde, gezeigt.
- Abbildung 29: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer CD-NH₂-TFMBA Oberfläche auf einem Epoxid-modifiziertem Siliziumwafer.
- Abbildung 30: Hochaufgelöstes XPS C1s Spektrum einer Epoxidoberfläche auf der sukzessiv CD-NH₂ und TFMBA immobilisiert wurde ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) (a) und Vergleich der C K-NEXAFS Spektren von TFMBA- bzw. CD-NH₂ – und TFMBA immobilisierten Epoxidoberflächen auf Siliziumwafer (b).
- Abbildung 31: Reaktionsschema der Komplexbildung von β -Amino-Cyclodextrin mit Ferrocen.
- Abbildung 32: Hochaufgelöstes XPS C1s Spektrum (a) and Fe2p Spektrum (b) eines CD-Ferrocen Komplexes auf Epoxid-funktionalisierter Siliziumwaferoberfläche ($h\nu = 385$ eV und 800 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm).

- Abbildung 33: XPS Übersichtsspektrum eines Cyclodextrin-Ferrocen Gast-Wirt-Komplexes auf einer Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberfläche (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°).
- Abbildung 34: Reaktionsschemen der reduktiven Aminierung von Maltotriose mit ATFMP (a) bzw. TFMBA (b).
- Abbildung 35: XPS C1s Spektren von Maltotriose mit ATFMP-Label (a) und Maltotriose mit TFMBA-Label (b), jeweils als Referenz durch spin coating auf Siliziumwafer als Schicht deponiert ($h\nu = 385$ eV, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von 1.1 nm).
- Abbildung 36: Reaktionsschemen der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von fluorierten Glykanen mit Aminolinker (Glc₃-ATFMP bzw. Glc₃-TFMBA) auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen.
- Abbildung 37: XPS C1s Spektrum (a) ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) und C K-NEXAFS-Spektrum (Epoxidoberfläche im Bild zum Vergleich) (b) einer Glc₃-ATFMP Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.
- Abbildung 38: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer Glc₃-ATFMP-immobilisierten Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.
- Abbildung 39: XPS C1s Spektrum (a) ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) und C K-NEXAFS-Spektrum (b) (Epoxidoberfläche im Bild) einer Glc₃-TFMBA Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.
- Abbildung 40: XPS Übersichtsspektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) einer Glc₃-TFMBA-immobilisierten Oberfläche auf einem Epoxid-funktionalisierten Siliziumwafersubstrat.
- Abbildung 41: Synchrotron XPS C1s (a) und N1s (b) Spektren einer Concanavalin A-Referenzprobe ($h\nu = 385$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von 1.1 nm).
- Abbildung 42: C K-NEXAFS (a) und N K-NEXAFS (b) -Spektren einer Concanavalin A Referenzprobe.

- Abbildung 43: Schema der Con A Inkubation mit fluorierten Glykanen auf Epoxidoberflächen (a) Die Blockierungsreaktion der verbliebenen Epoxidgruppen ist ebenfalls dargestellt (b).
- Abbildung 44: Hochaufgelöste XPS C1s Spektren der Glc₃-ATFMP-Con A-Oberfläche **10** (a) und Glc₃-TFMBA-Con A **11** (b) ($h\nu = 385$ eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm).
- Abbildung 45: XPS Übersichtsspektren (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 60°) und hochaufgelöste Synchrotron XPS F1s- und N1s-Spektren ($h\nu = 780$ eV und 500 eV, HE-SGM Beamline BESSY, Emissionswinkel = 60°, Informationstiefe von 1.1 nm) der Glc₃-ATFMP-Con A-Oberflächen **10** (a) und Glc₃-TFMBA-Con A-Oberflächen **11** (b) nach der Interaktion mit den Lektinen Con A.
- Abbildung 46: C K-NEXAFS Spektren von Glc₃-ATFMP-Con A-Interaktion **10** (a) und Glc₃-TFMBA-Con A-Interaktion **11** (b).
- Abbildung 47: N K-NEXAFS Spektren von Glc₃-ATFMP-Con A-Interaktion **10** (a) und Glc₃-TFMBA-Con A-Interaktion **11** (b).
- Abbildung 48: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes O1s-Spektrum (a) und XPS C1s Spektrum (b) einer GOPTS-funktionalisierten Glasoberfläche (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe von ~10 nm).
- Abbildung 49: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung von Dextranhydrolysat mit 2-Aminobenzamid (2-AB) (a); Reaktionsschema der Ringöffnungsreaktion für die Immobilisierung von Glc₄-AB und anschließender Con A Inkubation (b).
- Abbildung 50: Microarray Layout mit dicht benachbarten Spots für die XPS-Messungen (a), Glucosederivat immobilisiert mit Aminolinker (b) und Glykanspots (Glc₄-AB) gemessen im XPS Abbildungsmodus für N1s Photoelektronen (c).
- Abbildung 51: XPS C1s Spektrum einer Glc₄-AB-immobilisierten Glasoberfläche vor (a) und nach dem Waschen in Natriumphosphatpuffer (b) (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).
- Abbildung 52: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes N1s-Spektrum einer Glc₄-AB funktionalisierten Glasoberfläche nach dem Waschen in Natriumphosphatpuffer (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).

- Abbildung 53: XPS C1s Spektrum (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm) einer Glc₄-AB-funktionalisierten Glasoberfläche nach Con A Inkubation **(a)** und das entsprechende, mit einem Fluoreszenzscanner aufgenommene Bild **(b)**.
- Abbildung 54: XPS Übersichtsspektrum und hochaufgelöstes N1s-Spektrum einer Glc₄-AB-ConA-Interaktion (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).
- Abbildung 55: XPS Übersichtsspektren von GOPTS funktionalisierten Glasoberflächen nach der Hydrolyse **(a)** und nach 160 Tagen einer Lagerung bei 4°C und ~60% Luftfeuchtigkeit **(b)** (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV, Kratos Axis Ultra DLD Spektrometer, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).
- Abbildung 56: XPS C1s Spektrum Glc₄-AB-Spots auf Glasoberflächen nach 5 (a) und 160 Tagen (b) Lagerung bei 4°C ($h\nu = 1486,6$ eV, Emissionswinkel = 0°, Informationstiefe ~10 nm).
- Abbildung 57: ToF-SIMS Abbildung eines Glykan Microarrays auf einer Glasoberfläche. CN⁻ wurde als Leitfragment der Glykane (hier Glc₄-AB) benutzt. Cl⁻ ist Bestandteil des Puffers.
- Abbildung 58: ToF-SIMS/PCA Analysen der Glc₄-AB-Spots auf Glasoberflächen nach verschiedenen Lagerungsbedingungen (A und B) und Lagerungszeiten (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 Tage). Lagerungsbedingung A: im Kühlschrank bei 4°C, B im Exsikkator bei Raumtemperatur; beide Lagerungen unter Laboratmosphäre. Die Punkte in (a) und (b) sind als Durchschnittswerte für wiederholte Analysen mit einem 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken für eine bestimmte Lagerzeit dargestellt (schwarz: Lagerungsbedingung A, rot: Lagerungsbedingung B. Entsprechende Loadings für PC1 werden für Lagerungsbedingung A (c) und B (e) gezeigt und für PC2 für Lagerungsbedingung A (d) und B (f).
- Abbildung 59: Microarray Layout für die Fluoreszenz-basierte Alterungsstudie zur Aktivität der Glykane Glc₄-AB und Glc₅-AB in der Interaktion mit Con A-Cy3. Die Interaktion von Con A-Cy3 mit Mannosamin (Man-NH₂) als Positivkontrolle und β -Amino-Cyclodextrin bzw. Pufferlösung als Negativkontrollen kann ebenfalls getestet werden.

Abbildung 60:	Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation der Glykanspots (Glc ₄ -AB) auf Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen mit ConA-Cy3 nach 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 Tagen Lagerung bei 4°C (Bedingung A) und 22°C (Bedingung B) jeweils vor und nach dem Waschen der frischen Glykan-Microarrays.
Tabelle 1a:	Überblick über die einzelnen Experimente an Glykan-Microarray Modellen auf Siliziumoberflächen mit den jeweils eingesetzten Verfahren der Oberflächenanalytik (TFAA = Trifluoressigsäure-anhydrid; TFMBA = Tifluormethylbenzylamin; CD = Cyclodextrin; Glc ₃ -TFMBA = Maltotriose mit Trifluormethylbenzylamin-Label; Glc ₃ -ATFMP = Maltotriose mit Aminotrifluormethylpyridin-Label; Con A = Concanavalin A).
Tabelle 1b:	Überblick über die einzelnen Experimente (Glasoberflächen) mit den gängigen Methoden der Oberflächenanalytik (Glc ₄ -AB = 4 verknüpfte Glucoseeinheiten mit Aminobenzamid-Label; Glc ₅ -AB = 5 verknüpfte Glucoseeinheiten mit Aminobenzamid-Label; Con A = Concanavalin A).
Tabelle 2a:	Theoretische stöchiometrie Verhältnisse und aus XPS ermittelte relative Peakflächen der C1s Komponenten im hochaufgelösten XPS Spektrum von TFAA derivatisierten bzw. TFMBA derivatisierten Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen.
Tabelle 2b:	Elementzusammensetzung von GOPTS-modifizierten, TFAA derivatisierten und TFMBA-derivatisierten Siliziumwaferoberflächen.
Tabelle 3:	TFAA- und TFMBA Derivatisierung zur Abschätzung der Ausbeute (=verfügbare Epoxidgruppen) ausgehend vom Fluor- und Stickstoffwert im XPS-Übersichtsspektrum und anhand der CF ₃ -Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum.
Tabelle 4a:	XPS Elementzusammensetzungen und C1s Komponenten-Peakflächen von Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen nach der Immobilisierung von Glc-NH ₂ .
Tabelle 4b:	Elementzusammensetzungen (XPS) von Glucosamin*HCl auf Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.
Tabelle 5a:	Mittels hochaufgelöster XPS ermittelte relative Peakflächen für C1s Komponenten bestimmt in Experimenten an der Siliziumwaferoberfläche, die an der β -Amino-Cyclodextrin an Epoxidgruppen immobilisiert wurde (Epoxidoberfläche 1 als Referenz).

Tabelle 5b:	Mit XPS ermittelte Element-Oberflächenkonzentrationen bestimmt in den Experimenten an der Siliziumwaferoberfläche, die an der β -Amino-Cyclodextrin an Epoxidgruppen immobilisiert wurde (Epoxidoberfläche 1 als Referenz).
Tabelle 6:	Verfahren zur Abschätzung der Ausbeute immobilisierter Cyclodextrin Moleküle auf Epoxidoberflächen ausgehend vom Fluor- und Stickstoffwert im XPS-Übersichtsspektrum und anhand der CF_3 -Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum nach TFMBA Immobilisierung auf Cyclodextrin Oberflächen.
Tabelle 7a:	Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und C1s Komponenten der Peakfläche von Epoxid-funktionalisierten Siliziumwaferoberflächen nach der Immobilisierung von Maltotriose mit ATFMP- bzw. TFMBA-Label.
Tabelle 7b:	Verfahren zur Abschätzung der Ausbeute immobilisierter Glykan Moleküle (Glucosamin, β -Amino-Cyclodextrin, Glc_3 -ATFMP und Glc_3 -TFMBA) auf Epoxidoberflächen ausgehend vom Stickstoff- bzw. Fluorwert im XPS-Übersichtsspektrum bzw. anhand der CF_3 -Komponente im hochaufgelösten C1s Spektrum.
Tabelle 8:	Elementzusammensetzung und Oberflächenkonzentrationen von Epoxidoberflächen nach Interaktion mit Concanavalin A, jeweils ohne und mit Absättigung freier Epoxidgruppen mit Ethanolamin (EA), sowie relative Peakflächen der C1s Komponenten in den hochaufgelösten XP Spektren.
Tabelle 9:	Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und relative C1s Komponentenpeakflächen von Siliziumoberflächen nach der Immobilisierung der fluorierten Maltotriose, Blockierung der verbliebenen Epoxidgruppen und anschließender Con A Inkubation (Oberflächen 10 und 11).
Tabelle 10:	Mit XPS ermittelte Elementzusammensetzungen und relative Peakfläche der C1s Komponenten von Epoxid-funktionalisierten Glasoberflächen, vor und nach der Immobilisierung von Glc_4 -AB und anschließender Con A Inkubation. [UW] und [W] bedeutet, dass ungewaschene und in Natriumphosphatpuffer gewaschene Microarrays analysiert wurden. EA bedeutet Ethanolamin.
Tabelle 11:	Elementzusammensetzungen (XPS Oberflächenkonzentrationen) und relative Peakflächen im hochaufgelösten C1s Spektrum für die Epoxid-funktionalisierte (GOPTS) Glasoberfläche 12 und die Glykanoberflächen (Glc_4 -AB) 13 nach 5 und 160 Tagen Lagerung der Microarrays entsprechend der Lagerbedingung A.

11. Danksagung

Professor Dr. Ulrich Panne danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, seinen Einsatz und seine Hilfe am erfolgreichen Abschluss der Dissertation und für sein Interesse an dieser Arbeit. Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Klaus Rademann für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Wolfgang E. S. Unger für die Chance das spannende und vielseitige Forschungsthema durchführen zu dürfen und für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Wolfgang E. S. Unger für die stete Bereitstellung seines Fachwissens (besonders der Physik) und dafür, dass er mir in seinem Arbeitskreis die Gelegenheit gab, dieses interessante Thema mit der Vielfalt an Messmöglichkeiten bei der BAM und bei BESSY II bearbeiten zu können.

Dr. Paul Dietrich danke ich, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die stete Unterstützung und für die Hilfe in allen theoretischen und praktischen Fragestellungen. Ich danke Dr. Paul Dietrich, dass ich von der Versuchsplanung, über die Analysen bis zur Ergebnisdiskussion jederzeit auf seine Unterstützung zählen konnte.

Für die stete Unterstützung bei den BESSY-Messzeiten bin ich Andreas Lippitz, Dr. Paul Dietrich, Henryk Kalbe, Nele Lange und Thomas Heinrich zu großem Dank verpflichtet. An Andreas Lippitz ergeht außerdem ein Dank für die Klärung vieler technischer Fragen. Ein Dankeschön geht an Dr. Markus Holzweber für die Durchführung der ToF-SIMS-Messungen. Dieter Treu danke ich für die XPS-Messungen meiner Proben.

Die Fluoreszenz-Messungen entstanden in einer Kooperation mit Herrn Dr. Wilfried Weigel von der Scienion AG Berlin. Bei ihm möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Mein weiterer Dank gilt Herrn Sergej Ivanov-Pankov, der mich während meines Gastaufenthaltes im Labor unterstützt hat. Weiterhin danke ich Herrn Sergej Ivanov-Pankov für die Fluoreszenz-Aufnahmen.

Die Synthese der Glykane für die Microarray Experimente entstanden in Kooperation mit Frau Véronique Blanchard von der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Bei ihr möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Aryaline Kamalakumar aussprechen für die Herstellung der Glykane. Weiterhin danke ich Aryaline Kamalakumar und Christian Schwedler für die MALDI-TOF-MS-Messungen sowie für die Unterstützung im Labor während meines Gastaufenthaltes.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen ehemaligen und momentanen Mitarbeitern des Fachbereichs 6.1 für die freundliche Atmosphäre und die nette Zusammenarbeit bedanken, ohne sie hätte die Arbeit sicher nicht so viel Spaß gemacht.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben und mir den nötigen Ausgleich verschaffen konnten.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und kenntlich gemachter Quellen angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den

Carolin Nietzold

13. Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

5.

Surface Chemical Characterization of Model Glycan Surfaces and Shelf Life Studies of Glycan Microarrays using XPS, NEXAFS spectroscopy, ToF-SIMS and Fluorescence Scanning

C. Nietzold, P.M. Dietrich, M. Holzweber, A. Lippitz, A. Kamalakumar, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, V. Blanchard, U. Panne, W.E.S. Unger, *Applied Surface Science*, **2018**, 459, 860 – 873.

4.

A sealable ultrathin window sample cell for the study of liquids by means of soft X-ray spectroscopy

D. Grötzsch, C. Streeck, C. Nietzold, W. Malzer, I. Mantouvalou, A. Nutsch, P.M. Dietrich, W.E.S. Unger, B. Beckhoff, B. Kanngießer, *Review of Scientific Instruments*, **2017**, 88, 123112.

3.

XPS Depth Profiling of Ultrathin Bioorganic Films with an Argon Gas Cluster Ion Beam
P.M. Dietrich, C. Nietzold, S. Alnabulsi, J. Moulder, M. Weise, W.E.S. Unger, *Biointerphases*, **2016**, 11, 029603.

2.

Cyclodextrin – Ferrocene Host – Guest Complexes on Silicon Oxide Surfaces
C. Nietzold, P.M. Dietrich, A. Lippitz, U. Panne, W.E.S. Unger, *Surface and Interface Analysis*, **2016**, 48, 606 – 610.

1.

Functional group quantification on epoxy surfaces by chemically derivatization (CD)-XPS
C. Nietzold, P.M. Dietrich, S. Ivanov-Pankov, A. Lippitz, T. Gross, W. Weigel, W.E.S. Unger; *Surface and Interface Analysis*, **2014**, 46, 668 – 672.

Berlin, den

Carolyn Nietzold

Vortrag– und Posterpräsentationen

Vorträge

3.

Charakterisierung von organischen Nanofunktionsschichten für biosensorische Anwendungen
C. Nietzold, P.M. Dietrich, M. Holzweber, A. Lippitz, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, U. Panne, W. E.S. Unger

23. Dresdner Vakuumtechnisches Kolloquium Beschichtung und Modifizierung von Kunststoffoberflächen

12.-15. Oktober 2015, Dresden

2.

XPS studies of epoxy surfaces and carbohydrate reference surfaces

C. Nietzold, P.M. Dietrich, S. Ivanov-Pankov, M. Holzweber, A. Lippitz, T. Gross, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

ECASIA 2013 – 15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis
13.-18. Oktober 2013, Cagliari, Sardinien, Italien

1.

Development of biosensor standard surfaces with carbohydrate probes
P.M. Dietrich, C. Nietzold, S. Ivanov-Pankov, V. Blanchard, A. Kamalakumar, M. Holzweber, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

ECASIA 2013 – 15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis
13.-18. Oktober 2013, Cagliari, Sardinien, Italien

Poster

11.

Surface Chemical Analysis of Carbohydrates on Epoxy-Functionalized Surfaces

C. Nietzold, P.M. Dietrich, A. Lippitz, U. Panne, W.E.S. Unger

ECASIA 2015 – 16th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis
28. September-01. Oktober 2015, Granada, Spanien

10.

Detection of protein attachment at functionalized solid-liquid interfaces by X-ray absorption spectrometry of carbon and nitrogen

C. Streeck, C. Nietzold, P.M. Dietrich, A. Nutsch, D. Grötzsch, W. Malzer, W.E.S. Unger, B. Beckhoff

16th International Conference on X-ray Absorption Fine Structure

23.-28. August 2015, Karlsruhe, KIT

9.

Analysis of Surfaces for Immobilization of Biomolecules using Soft X-Ray Spectrometry

A. Nutsch, C. Streeck, J. Weser, B. Beckhoff, D. Grötzsch, W. Malzer, P.M. Dietrich, T. Fischer, C. Nietzold, K. Rurack, W.E.S. Unger

International Conference on Frontiers of Characterization and Metrology for Nanoelectronics (FCMN)

14.-16. April 2015, Dresden

8.

XPS and NEXAFS study of biointerfaces for microarray applications

C. Nietzold, P.M. Dietrich, A. Lippitz, A. Kamalakumar; V. Blanchard, U. Panne, W.E.S. Unger

6th Joint BER II and BESSY II Users' Meeting

03.-05. Dezember 2014, Berlin, Deutschland

7.

A fluid cell for the investigation of biomolecular films at liquid-solid interfaces

D. Grötzsch, W. Malzer, B. Kanngießer, C. Streeck, A. Nutsch, B. Beckhoff, C. Nietzold, P.M. Dietrich, W.E.S. Unger

EMRS Spring Meeting 2014 (European Materials Research Society)

26.-30. Mai 2014, Lille Grand Palais, Frankreich

6.

XPS studies of epoxy surfaces used for potential carbohydrate reference arrays

C. Nietzold, P.M. Dietrich, M. Holzweber, A. Lippitz, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

16th JCF Frühjahrssymposium

26.-29. März 2014, Jena

5.

Synchrotron-XPS and -NEXAFS studies of epoxy surfaces used for production of carbohydrate microarrays

C. Nietzold, P. Dietrich, M. Holzweber, A. Lippitz, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

Advances in Microarray Technology

10.-11. März 2014, Berlin

4.

XPS and NEXAFS studies of epoxy surfaces

C. Nietzold, P.M. Dietrich, S. Ivanov-Pankov, M. Holzweber, A. Lippitz, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

5th Joint BER II and BESSY II Users' Meeting

04.-06. Dezember 2013, Berlin, Deutschland

3.

XPS studies of epoxy surfaces used for carbohydrate reference surfaces and arrays,
C. Nietzold, P.M. Dietrich, S. Ivanov-Pankov, M. Holzweber, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

5th Potsdam Days on Bioanalysis 2013

07.-08. November 2013, Potsdam, Deutschland

2.

Towards speciation of biochemical marker molecules in liquid ambient by X-ray absorption spectroscopy

C. Streeck, A. Nutsch, P.M. Dietrich, C. Nietzold, D. Grötzsch, W. Malzer, W.E.S. Unger and B. Beckhoff

ECASIA 2013 – 15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis
13.-18. Oktober 2013, Cagliari, Sardinien, Italien

1.

Synchrotron-XPS studies of epoxy surfaces used for carbohydrate reference surfaces and arrays

C. Nietzold, P.M. Dietrich, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, U. Panne, W.E.S. Unger

BAM-Doktorandentag 2013

03.September 2013

Berlin, den

Carolin Nietzold